



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNologiÍ

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

OBRAZOVÁ ANALÝZA MITOTICKÝCH CHROMOSOMŮ

DIGITAL IMAGE ANALYSIS OF MITOTIC CHROMOSOMES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. TEREZA DANIELOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. HELENA ŠKUTKOVÁ

BRNO 2014



**VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ**

**Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií**

Ústav biomedicínského inženýrství

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor
Biomedicínské inženýrství a bioinformatika

Studentka: Bc. Tereza Danielová

ID: 125016

Ročník: 2

Akademický rok: 2013/2014

NÁZEV TÉMATU:

Obrazová analýza mitotických chromosomů

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proved'te literární rešerši cytogenetických metod pro identifikaci chromosomů z mikroskopických snímků a zhodno'tte jejich výhody a nevýhody pro analýzu počtu a struktury chromosomů. 2) Seznamte se s technikami zpracování obrazových snímků cytogenetické analýzy chromosomů pro určení karyotypu organismů a vyhodnocení změn v počtu a struktuře chromosomů způsobujících genetická onemocnění. 3) Navrh'něte a realizujte algoritmus pro vyhodnocení karyotypu člověka ze snímků mitotických chromosomů. 4) Algoritmus rozšířte o vyhodnocení strukturálních změn chromosomů oproti typickému lidskému karyotypu s využitím chromosomových ideogramů. 5) Vytvořte programové rozhraní v Matlabu pro vyhodnocení lidského karyotypu, chromosomových ideogramů a genetických změn. 6) Program otestujte na volně dostupných cytogenetických snímcích lidských chromosomů a proved'te diskuzi výsledků.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

- [1] GAJENDRAN, V., RODRI, X a J. J. GUEZ. Chromosome counting via digital image analysis. In Image Processing, 2004. ICIP '04. 2004 International Conference on. 2004, vol. 5, p. 2929-2932 Vol. 2925.
- [2] PIPER, JIM a ERIK GRANUM. On fully automatic feature measurement for banded chromosome classification. Cytometry, 1989, 10(3), 242-255.

Termín zadání: 10.2.2014

Termín odevzdání: 23.5.2014

Vedoucí práce: Ing. Helena Škutková

Konzultanti diplomové práce:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

Abstrakt

Tato diplomová práce je zaměřena na obrazovou analýzu mitotických chromosomů. Zabývá se návrhem celého procesu zpracování digitálních snímků – od předzpracování snímků, až ke klasifikaci jednotlivých chromosomů, včetně jeho testování na sadě obrázků. V teoretické části práce jsou popsány cytogenetické metody, které se používají pro vizualizaci chromosomů. Tato práce se v praktické části zabývá morfologickými operacemi a klasifikačními postupy. Klasifikace chromosomu byla do 5 skupin (A - G). Všechny algoritmy jsou realizovány v prostředí MATLAB.

Klíčové slova

Cytogenetika, Chromosom, Lidský karyotyp, G-pruhování, Morfologické operace, Skeletonizace, Konturace, Jasový profil

Abstract

This master's thesis is focused on digital image analysis of mitotic chromosomes. It deals with the design of the processing of digital images - from image preprocessing to classification of each chromosomes, including testing on a set of images. This work introduces used cytogenetic methods, that are used to visualize chromosomes. In its practical part describes morphology operations and classification procedure.

Classification of the chromosomes was divided into 5 groups (A-G). All algorithms were created in the MATLAB program.

Keywords

Cytogenetic, Chromosome, Human karyotype, G-band, Morphological operations, Skeletonize, Contour, Intensity profile

DANIELOVÁ, T. *Obrazová analýza mitotických chromosomů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2014. 60 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Helena Škutková.

Prohlášení

Prohlašuji, že mou diplomovou práci na téma „Obrazová analýza mitotických chromosomů“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujícího autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009Sb.

V Brně dne 22. května 2014

.....

podpis autora

Poděkování

Děkuji vedoucí diplomové práce Ing. Heleně Škutkové a RNDr. Evě Popelínské za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé diplomové práce.

V Brně dne 22. května 2014

.....

podpis autora

Obsah

Seznam obrázků	9
Seznam tabulek	11
Úvod.....	12
1. Cytogenetika	13
1.2 Struktura lidského chromosomu	14
1.3 Morfologie chromosomu.....	15
1.3.1 Centromera.....	16
1.3.2 Telomery	17
2. Lidský karyotyp	18
2.1 Karyotyp.....	19
2.2 Chromosomální abnormality.....	21
3. Analýza mitotických chromosomů	25
3.1 Cytogenetické metody barvení chromosomů	25
4. Návrh a realizace algoritmu karyotypizace	30
4.1 Předzpracování obrazu	31
4.1.1 Transformace jasu	32
4.1.2 Globální metody prahování	32
4.1.3 Morfologické úpravy	34
4.1.4 Rozshlukování	37
4.2 Detekce chromosomů.....	40

4.2.1	Skelety	41
4.2.2	Jasový profil.....	43
4.2.3	Obsah chromosomů	44
4.3	Karyotyp.....	46
5.	Vyhodnocování tvorby karyotypu	51
	Závěr	58
	Seznam zkratek.....	60
	Literatura.....	61
	Přílohy.....	65

Seznam obrázků

Obr. 1.1:Schéma sbalení chromatinu v lidském chromosomu [1].....	15
Obr. 1.2: Schéma rozdělení chromosomů podle centromery.....	16
Obr. 2.1: Normální mužský karyotyp (46,XY), G-pruhování	18
Obr. 2.2: Ideogram a karyotyp 46.XX	19
Obr. 2.3: Ideogram chromosomu č. 9 s vyznačeným místem q22[6]	20
Obr. 2.4:Trisomie chromosomu 21(Downův syndrom), ženský karyotyp (47,XX,+21)	22
Obr. 2.5:Strukturální chromosomové změny[8]	24
Obr. 3.1: Ukázka klasického barvení chromosomů	26
Obr. 3.2: Lidský mužský karyotyp, G-pruhování, 46 XY	27
Obr. 3.3: Ukázka C-pruhování[1]	28
Obr. 3.4: Ukázka metody FISH	29
Obr. 4.1: Základní blokové schéma detekce mitotických chromosomů.....	30
Obr. 4.2: Mikroskopický snímek, 46,XX, G-pruhování	31
Obr. 4.3: Blokové schéma předzpracování obrazu	31
Obr. 4.4:Obrazy po transformaci jasu a prahování	34
Obr. 4.5: Odstranění nečistoty, která byla detekována jako chromosom	35
Obr. 4.6: Morfologické operace.....	36
Obr. 4.7:Obraz s vyznačenou hranicí rozdělení chromosomů.....	37
Obr. 4.8: Binární obraz s rozdělenými chromosomy	38
Obr. 4.9: Rozshlukování chromosomů	39
Obr. 4.10: Postupné rozshlukování chromosomů	40
Obr. 4.11: Blokové schéma detekce chromosomů	40

Obr. 4.12: Ukázka principu dopočítávání úseků skeletu	41
Obr. 4.13: Ukázka dopočítání skeletů pomocí dvou metod.....	42
Obr. 4.14: Ideogram a jasový profil chromosomu	43
Obr. 4.15: Jasové profily.....	44
Obr. 4.16: Seřazené chromosomy podle obsahu.....	45
Obr. 4.17: Blokové schéma postupu vyhodnocování párů	46
Obr. 4.18: 2D jasový profil porovnávaných chromosomů	47
Obr. 4.19: Grafické srovnání jasových profilu chromosomu	48
Obr. 4.20: Chromosomový pár s ideogramem páru č.17	49
Obr. 4.21: Jasový profil chromosomů č. 17 a č. 20	49
Obr. 4.22: Výsledek přiřazení chromosomu ve skupině A	50
Obr. 5.1: Chromosomový shluk, jasové profily daného shluku	51
Obr. 5.2: Ukázka nepřesného převedení detekovaného chromosomu na jasový profil..	52
Obr. 5.3: Výsledný ženský karyotyp z Obr. 4.2	53
Obr. 5.4: Mikroskopický snímek, 46XY	55
Obr. 5.5: Výsledný mužský karyotyp - korelace	55

Seznam tabulek

Tabulka 1: Ukázka zápisu strukturálních změn na chromosomu [7].....	21
Tabulka 2: Jednotlivý popis chromosomových skupin A až G	26
Tabulka 3: Základní předpoklady pro třídění chromosomu podle počtu konců.....	37
Tabulka 4: Výsledky párování chromosomů – z Obr. 4.2, 46,XX	54
Tabulka 5: Výsledky párování chromosomů - Obr. 5.4 , 46XY.....	56

Úvod

Chromosomální vyšetření je nedílnou součástí při genetických diagnostických vyšetření. Při buněčném dělení se nosič genu zhušťuje a tvoří v jádře buňky chromosomy. Chromosomy je možno pozorovat v optickém mikroskopu a seřadit podle velikosti a charakteristických pruhů do karyotypu. Umístění každého genu je možno popsat číslem chromosomu a určitým pruhem. V normálním lidském jádře je 23. párů chromosomů, které jsou označeny podle velikosti a rozložení pruhů čísly 1 až 22 a poslední 23. pár tvoří pohlavní chromosomy XX nebo XY.

Pokud lze ve světelném mikroskopu rozeznat poruchy tvaru anebo počtu chromosomu, numerickou či strukturální aberaci, je postižen celý blok genů. Může chybět část či celý chromosom, ale jsou i případy, kdy naopak část chromosomu nebo celý chromosom je zmnožen. Chromosomální aberace mohou být získány dědičně nebo vzniknout nově. Pokud je aberace přítomná již v oplozeném vajíčku, pak je zasaženo velké množství genetického materiálu ve všech buňkách organismu. Tím je vysvětlená mnohočetnost vad u nositelů chromosomálních aberací. Nejčastější aberace jsou spojeny s typickým komplexem příznaku (syndromů). Mezi nejčastější syndromy patří Downův syndrom (trisomie chromosomu 21), Edwardův syndrom (trisomie chromosomu 18) a Patauův syndrom (trisomie chromosomu 13). Další aberace se vyskytují i u pohlavních chromosomů. I když aberace pohlavních chromosomů jsou často příčinou spontánních abortů, pokud přežijí prenatální období, nemusejí způsobit svému nositeli život ohrožující vady. Dominantní postižení u aberací pohlavních chromosomů je porucha plodnosti nositele.

První část práce obsahuje literární rešerši představující nejpoužívanější soudobé cytogenetické techniky k vyhodnocení lidských chromosomů v jádře buňky. Dále je uveden význam karyotyp a postup, jak získat ze vzorku lidské tkáně mikroskopický snímek mitotických chromosomů.

Následující kapitoly byly zaměřené na detekci mitotických chromosomů z mikroskopického snímku. V kapitole byly popsány metody, které byly vyzkoušeny pro realizaci karyotypu a zhodnoceny.

1. Cytogenetika

Klinická cytogenetika se zabývá studiem chromosomů, jejich struktury a dědičnosti ve vztahu ke klinicko-genetické praxi. Mikroskopicky pozorovatelné změny počtu nebo struktury chromosomů se mohou podílet výrazně na vyjádření mnoha klinických příznaků. Chromosomální analýza se nyní již s výraznější přesností a spolehlivostí stává významnější diagnostickou procedurou i v dalších odvětví medicíny. Chromosomální poruchy jsou jednou z kategorií genetických chorob, s kterými se můžeme setkat např. při reprodukci, vrozených malformací, mentální retardací a hrají roli i při patologických nádorových onemocněních.

Cytogenetické poruchy jsou přítomny asi u 1 % živě narozených dětí, 2 % u těhotných žen starších než 35 let a u plné poloviny všech spontánních potratů v prvním trimestru.

Různé typy numerických či strukturálních abnormalit lze pozorovat z lidského karyotypu.[1][2]

1.1 Klinická indikace cytogenetického vyšetření

Chromosomální vyšetření je nedílnou součástí řady obvyklých diagnostických postupů. Indikují se v případě výskytu mnoha specifických fenotypových příznaků známých v klinické medicíně, např. Downův syndrom, Edwardsův syndrom nebo Palauův syndrom. Kromě toho existují i některé nespecifické situace:

1. Problém časného růstu a vývoje
2. Narození mrtvého plodu a úmrtí novorozence – v těchto případech je stanovení karyotypu nezbytné pro správné genetické poradenství a může být důležitou informací pro případnou prenatální diagnostiku při příštích těhotenstvích.
3. Problémy s fertilitou
4. Rodinná anamnéza
5. Nádorové onemocnění – chromosomové vyšetření vzorku příslušné tkáně
6. Těhotenství u žen v pokročilém věku (30-35 let)

Pro rychlé klinické vyšetření jsou ideální buněčné kultury připravené z periferní krve, jedna z nevýhod spočívá v krátké životnosti vzorku. Další vzorek můžeme získat z kostní dřeně pomocí biopsie. Zde výhoda spočívá v tom, že obsahuje velký podíl dělicích se buněk, ale nevýhodou je, že obsahuje i nekvalitní, krátké a špatně

rozprostřené chromosomy. Jejich analýza je obtížnější než u vzorku z periferní krve. Buňky plodu jsou izolované pro chromosomovou analýzu z plodové vody (amniová tekutina) nebo biopsii choriových klků.[1][2]

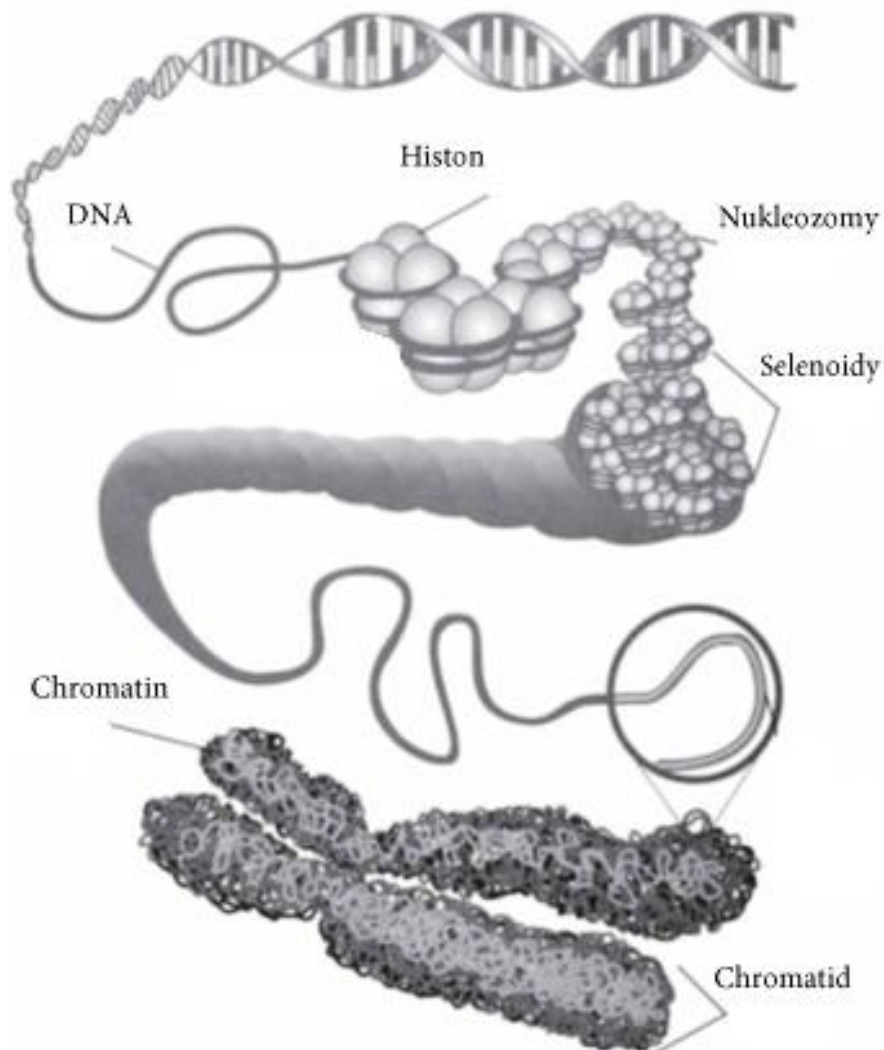
1.2 Struktura lidského chromosomu

Lidský genom jak s kódujícími tak i regulačními prvky je obsažený v DNA, která je rozdělena do 46 chromosomů. Každý chromosom obsahuje kontinuální vlákno dvoušroubovice uspořádané DNA, tzn. každý jaderný chromosom je jedna dlouhá DNA. Chromosomy nejsou složené jenom z DNA, ale na složení se podílí i specifické proteiny. V chromosomálních strukturách se DNA vyskytuje se zásaditými chromosomálními proteiny (histony) a kyselými chromosomálními proteiny (non-histony). Non-histony jsou zřejmě rozhodující pro vytvoření normálních chromosomálních charakteristik a správnou expresi jednotlivých genů.

Komplex DNA společně s chromosomálními proteiny nazýváme chromatin. U histonů rozeznáváme pět základní typů, které se podílí na správném sbalení chromatinového vlákna. Dvě kopie z každého histonu H2A, H2B, H3 a H4 tvoří komplex, tzn. oktamer. Kolem jednotlivých oktameru se obtáčí dvoušroubovice DNA. Jednotlivé histonové oktamery jsou vzájemně propojeny mezeríkovou sekvencí DNA. Tímto způsobem to pokračuje dále podle jednotlivých vláken DNA chromosomu, které si můžeme představit jako „korálky na šňůrce“. Takto tvořené komplexy nazýváme nukleozomy. Pátý histon H1 se váže na DNA na rozhraní mezeríkové sekvence mezi jednotlivé nukleozomy (Obr. 1.1).

Během buněčného cyklu postupují chromosomy řízeným cyklem kondenzace a dekonenzace. V interfázickém jádře jsou chromosomy a chromatiny relativně méně kondenzované ve srovnání s kompaktním stavem chromatinu v metafázi. Dlouhá vlákna složená z nukleotidů jsou dál těsně svinutá do dlouhých chromatidových struktur. Takto uspořádané vlákno se nazývá solenoid. Solenoidy jsou organizované do smyček, které jsou spojené s non-histonovým proteinem skeletem. Předpokládá se, že tyto smyčky DNA jsou jejich funkční jednotky z hlediska replikace nebo transkripce. Genová exprese je z části regulována i tím, jak je obsazený gen a DNA zabalená v jednotlivých chromosomech.

Chromosomy dosahují největšího rozsahu během mitotické metafáze. Kondenzované chromosomy lze velmi dobře obarvit a tím rozlišit a spočítat. To má význam při cytogenetických vyšetření.[1][2][3][12]



Obr. 1.1: Schéma sbalení chromatinu v lidském chromosomu [1]

1.3 Morfologie chromosomu

V průběhu interfáze jsou chromosomy v buněčném jádře dekondenzovány. V takovém stavu nelze chromosomy mikroskopicky pozorovat. V metafázi se chromosomy kondenzují, a takto připravené chromosomy je již možno mikroskopicky pozorovat.

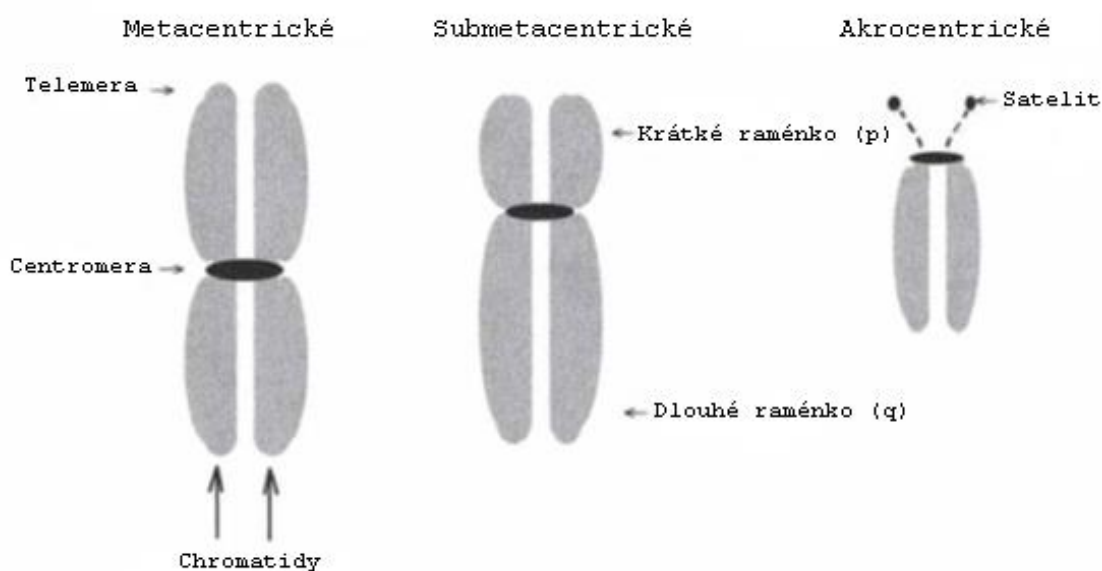
Chromosomy vypadají jako podlouhlé objekty se dvěma raménky a mezi nimi je ztenčená oblast zvaná primární zaškrčení (centromera). Koncové oblasti ramének se nazývají telomery. Chromosom je tvořen dvěma chromatidy, které jsou v oblasti centromery spojeny, neboť jde o fázi buněčného dělení, kdy nedošlo k replikaci DNA. [1][3][4][12]

1.3.1 Centromera

Centromera je viditelné zúžení v metafázi chromosomů, kde jsou obě sesterské chromatidy spojeny dohromady. Centromera je nezbytná při buněčném dělení pro přežití chromosomů. Interakce s mitotickým vřeténkem během buněčného dělení dochází v oblasti centromery. Vlákná dělicího vřeténka jsou funkční prvky, které oddělují sesterské chromatidy v buněčném dělení.

Lidské chromosomy se dělí na základě polohy centromery v chromosomu. Podle umístění centromery dělíme chromosomy na metacentrické, submetacentrické a akrocentrické chromosomy (Obr. 1.2)

Metacentrické chromosomy mají umístěnou centromeru v blízkosti středu, takže délka krátkého a dlouhého raménka je poměrně stejná. U submetacentrických chromosomů je centromera umístěná, tak aby rozdělovala chromosom na krátké a dlouhé rameno. Akrocentrický chromosom má umístěnou centromeru u jednoho konce tak, že jedno chromozomální rameno je krátké a druhé rameno dlouhé. Krátké ramínko u tohoto chromosomu je charakteristické satelitem. Kinetochor má složitou proteinovou strukturu, která funguje na molekulární úrovni. Zpravidla se nachází v oblasti centromery, kde umožňuje napojení chromosomu na dělicí vřeténko. [1][3][4]



Obr. 1.2: Schéma rozdělení chromosomů podle centromery

1.3.2 Telomery

Telomery jsou koncové úseky na chromozomech, které jsou tvořeny specifickými opakujícími se sekvencemi. Telomery fungují jako ochranné kryty na koncích chromosomu. Mají velký význam při stabilizaci struktury chromosomů, chrání chromosomy před degradačními účinky enzymu a zabráňují vzájemným translokacím chromosomů.

Z hlediska stavby jsou tvořeny nukleoproteinovým komplexem, tedy DNA a skupina různých proteinů. DNA složka telomer je tvořena specifickými repetitivními sekvencemi, konkrétně nukleotidová sekvence 5'-TTAGGG-3'. Telomera je zakončena určitým přesahem jednoho vlákna jinak dvoušroubovicová DNA. Při replikaci DNA na koncích molekuly DNA dochází k tomu, že DNA-polymeráza není schopná provést replikaci volné části telomery až do úplného konce. Po ukončení replikace se pokaždé určitý úsek telomery „zkrátí“. V průběhu života organismu s narůstajícím počtem uskutečněných buněčných dělení se zkracuje i délka telomer v jednotlivých buňkách. Délka telomer hraje důležitou roli v životě buňky, příliš krátké telomery jsou jakýmsi markerem stáří buňky a zároveň „začátkem konce“ buňky, která se již dál nebude dělit a zanikne. Telomery mají přímou spojitost se stárnutím[1][4][5].

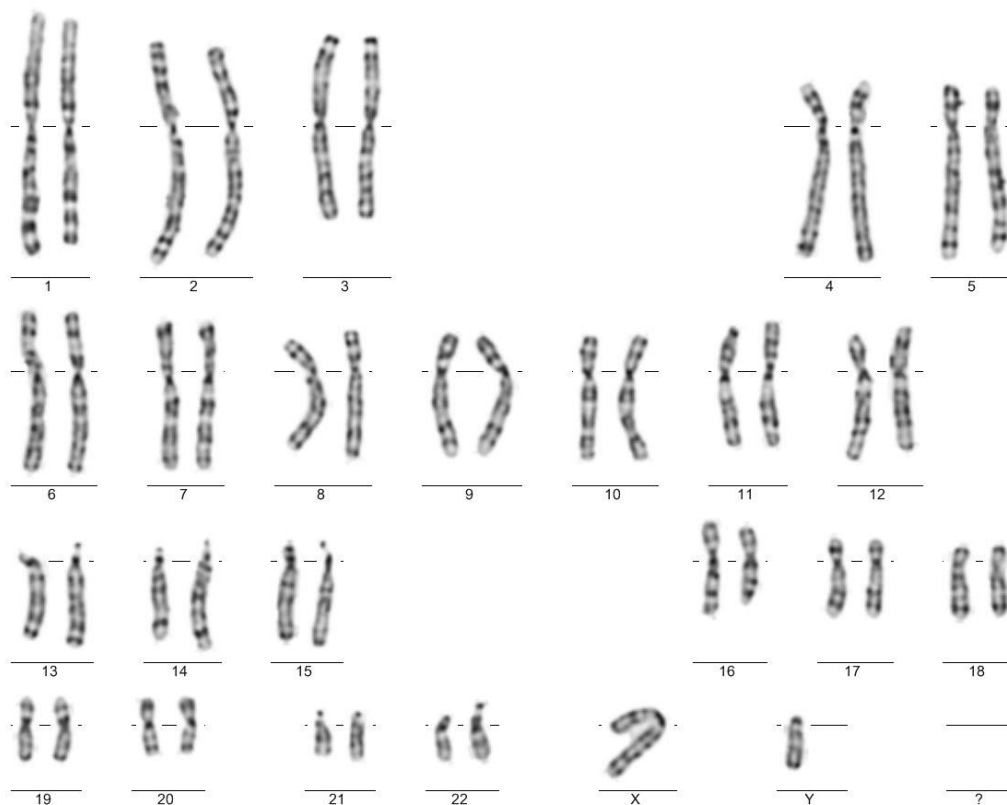
2.Lidský karyotyp

Chromosomy z dělicí buňky jsou nejlépe pozorovatelné v profázi nebo metafázi. V těchto fázích jsou chromosomy pod mikroskopem viditelné jako chromosomový rozptýl a na každém chromosomu lze pozorovat sesterské chromatidy spojené centromerou.

Většina chromosomů může být rozlišena nejen na základě jejich délky, ale i z hlediska lokalizace centromery. Při této metodě se chromosomy pouze obarví konvenční barvou, aby bylo možné spočítat celkový počet chromosomu. Dále se klasifikují do skupin A až G.

Nejčastější používanou metodou v cytogenetice je G-pruhování pomocí Giemsova barviva. Použití této nebo další z tzv. pruhovacích metod můžeme individuálně rozeznat všechny chromosomy. Navíc mohou být snadno rozpoznány strukturální i numerické abnormality.

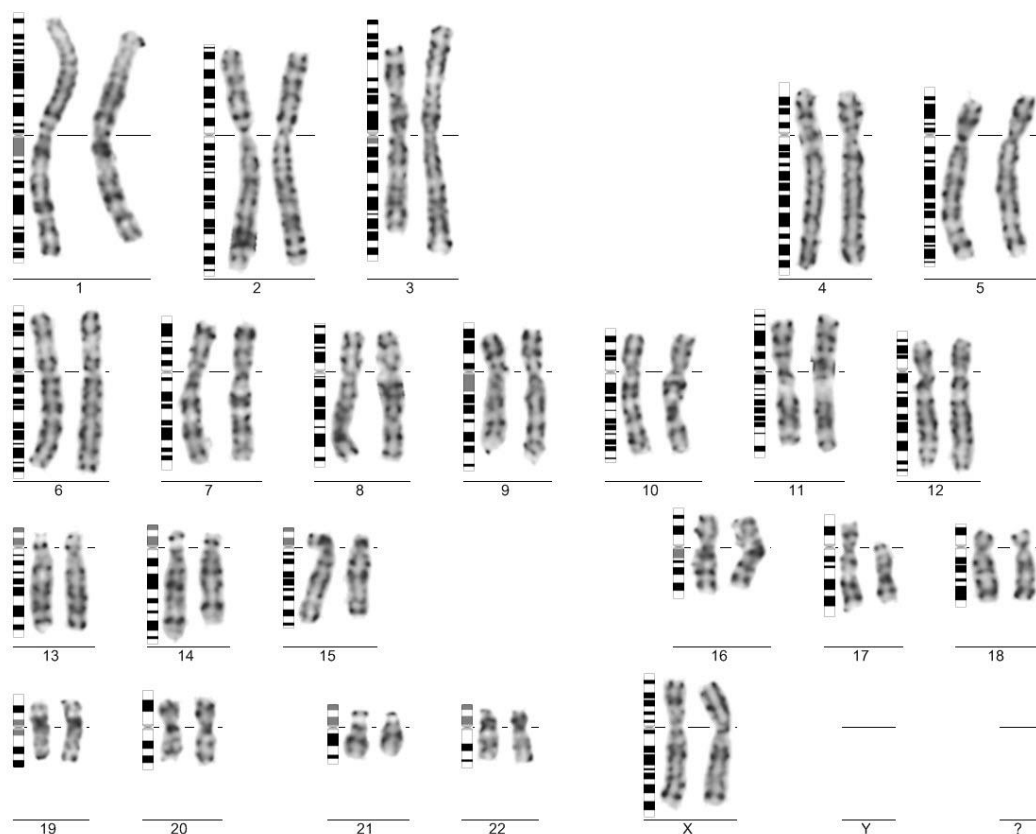
Chromosomová analýza má běžný postup, který spočívá v sejmutí mikroskopického obrazu a následné seřazení chromosomu do párů dle standardní klasifikace, jak je zobrazeno na Obr. 2.1. Výsledný obraz chromosomové analýzy nazýváme karyotyp.[1][2][4]



Obr. 2.1: Normální mužský karyotyp (46,XY), G-pruhování

2.1 Karyotyp

Karyotyp je soubor všech chromosomů v jádře buňky, které jsou klasifikovány podle Mezinárodního systému pro cytogenetické nomenklatury (ISCN). V ISCN je systém číslování chromosomů od centromery. Krátké ramínko chromosomu nese označení p (z francouzštiny, petite) a dlouhé ramínko je označené q (následuje po p). Ramínka jsou rozdělené do regionů a jsou k nim přiřazené čísla, které se zvyšují od centromery k telomerám. Každý napruhovaný chromosom má charakteristické pruhy, které odpovídají danému chromosomu v ideogramu. Číslování se využívá pro jednoznačnou a přesnou lokalizaci pruhů a také určení rozsahu a lokalizaci chromosomových abnormalit.[1][2][6][14]

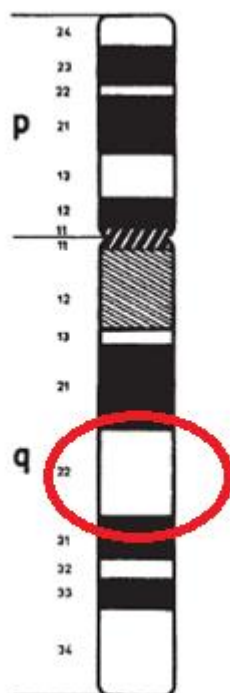


Obr. 2.2: Ideogram a karyotyp 46.XX

Na Obr. 2.2 je znázorněný ideogram u jednotlivých párů chromosomů. Zde jsou vidět charakteristické rysy (proužky) pro jednotlivé páry, podle kterých se řadí chromosomové páry do karyogramu.

Při zápisu karyotypu se uvádí jako první informace celkový počet chromosomů v buňce, včetně pohlavních chromosomů. Za celkový počet chromosomů se zapisuje, o jaký typ karyotypu se jedná, jestli ženský nebo mužský.

Normální ženský karyotyp je zapsán 46, XX a normální mužský karyotyp 46, XY. Pokud se v karyotypu vyskytují chromosomy navíc nebo se nějaký chromosom nevyskytuje, tak za pohlavní chromosomy se запиše číslo chromosomu, který přebývá nebo chybí např. u trisomie chromosomu 21 (Downův syndrom) u ženského pohlaví vypadá zápis následovně 47, XX, +21. V případě výskytu strukturální změny v chromosomech, zjistíme porovnáním s ideogramem místo, kde došlo ke změně struktury a zapíšeme pomocí stanovených symbolu změny v karyotypu. Změny se opět uvádí za pohlavní chromosomy. Např.: 46, XX, add(9) (q22), ze zápisu vyplývá, že se jedná o karyotyp se 46 chromosomy ženského typu s genetickým materiálem navíc na 9. chromosomu v lokaci dlouhého ramínka 22., viz Obr. 2.3 zobrazující ideogram chromosomu č. 9 a vyznačené místo, které se popisuje v příkladu. [2][6]



Obr. 2.3: Ideogram chromosomu č. 9 s vyznačeným místem q22[6]

Tabulka 1: Ukázka zápisu strukturálních změn na chromosomu [7]

Značení	Popis	Příklad
-	Chybějící chromosom	45,XX,-21
/	Mozaika	Mos45,X[85]/46,XX[15]
+ (plus)	Nadbytečný chromosom	47,XX,+21
del	Delece	46,XY,del(5)(q13q33)
der	Derivovaný chromosom	46,XX,der(2)t(2;5)(p12;q13)mat
Dup	Duplikace	46,XY,dup(1)(q22q25)
I	Izochromosom	46,XY,i(X)(q10)
Inv	Inverze	46,XY,inv(2)(p21q31)
Mar	Marker chromosom	47,XX,+mar
R	Ring chromosom	46,XY,r(7)
T	Translokace – reciproká	46,XX,t(2;5)(p12;q31)
Dic	Dicentrický chromosom	45,XX,dic(13;15)(q22;q24)

2.2 Chromosomální abnormality

Abnormality lidských chromosomů mohou být buď numerické, nebo strukturální. Mohou zahrnovat jeden nebo více autosomů, popř. pohlavních chromosom, nebo autosomy i gonosomy současně.

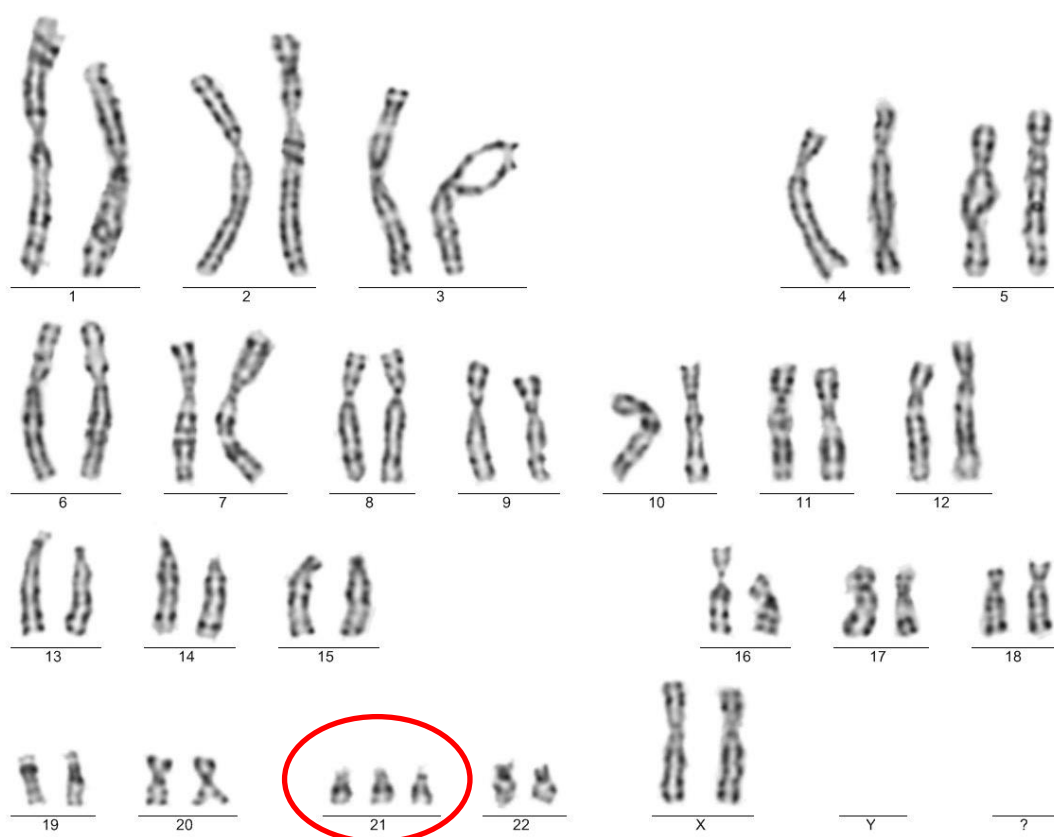
Nejčastějším typem chromosomových abnormalit je aneuploidie a polyploidie. Polyploidie se projevuje zmnožením celé sady chromosomů např. $3n$ – triploidie (69 chromosomů). Je možný vznik triploidní zygoty např. po oplození vajíčka dvěma spermii. Triploidie není slučitelná s přežitím plodu. Těhotenství končí potratem. Skupiny polyploidních buněk se mohou u člověka vyskytovat v některých tkáních (kostní dřeň nebo regenerující se játra).

Aneuploidie je změna jednotlivých homologických chromosomů např. trisomie $2n+1$ (47 chromosomů), monosomie $2n-1$ (45 chromosomů). Ke vzniku aneuploidie může dojít během meiózy při nesprávném transportu chromosomů nebo chromatidu k pólům buňky anebo i během mitotického dělení. Chyba v rozchodu chromatinu při mitotickém dělení vede ke vzniku klonů aneuploidních buněk k tzv. mozaice.

Vybrané nejčastější příklady numerických odchylek chromosomů:

- Downův syndrom (Obr. 2.4) jedná se o trisomii chromosomu 21. Charakteristickým klinickým příznakem je zpomalený vývoj, mentální retardace, duševní zaostalost, krátké široké ruce, malá postava, široká plochá tvář, oční řasa, vrozené vývojové vady. [24][23]

- Patauův syndrom – trisomie chromosomu 13. Klinické příznaky jsou mentální postižení, hluchota, rozštěp rtu, anomálie vývoje srdce, ledvin a pohlavních orgánů. Postižení jedinci umírají do prvního měsíce života. [21][23]
- Edwardsův syndrom je podmíněn karyotypem 47,XX,+18 nebo 47,XY,+18. U postižených jedinců bývají zdvojené ledviny, malá ústa, deformity prstů. Postižení jsou duševně zaostalí a většina postižených jedinců umírá během prvních šesti měsíců po narození. [21][23]
- Turnerův syndrom je monosomie chromosomu X (45, X) a syndrom tří X (47,XXX) tzv. Superfemalé způsobují neplodnost. Syndrom dvou Y (47,XYY) tzv. Supermale jsou většinou náhodně odhaleny a nemají klinické příznaky. [22][23]



Obr. 2.4: Trisomie chromosomu 21 (Downův syndrom), ženský karyotyp (47,XX,+21)

Strukturální odchylky v chromosomech vznikají nejčastěji v důsledku chromosomálních zlomů. Mohou také nastat po chybném průběhu rekombinace.

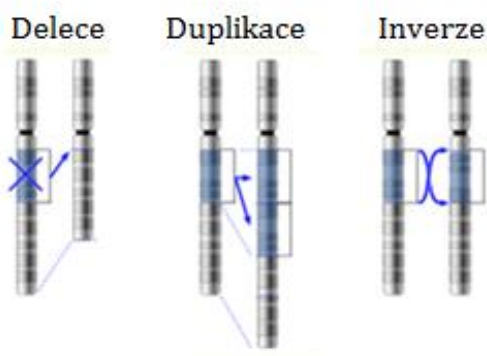
K chromosomálním zlomům dochází po působení mutagenu. K mutagenním účinkům, což jsou chemické látky, záření nebo i biologické faktory, jsou náchylnější buňky, které se dělí, než buňky v interfázi. V interfázi se po proběhlé mitóze uplatňují respirační mechanismy, které vzniklé chyby opravují. Někdy však dojde k napojení nesprávných úseků porušených chromosomů. Tímto způsobem dochází k různým strukturálním přestavbám. Jestliže je zachována centromera a telomery, vzniká stabilní strukturní přestavba, která může být předána do další generace. Při ztrátě centromery a telomer vzniká nestabilní přestavba tzn., že fragment chromosomu je v následující mitóze eliminován nebo dojde k dalším změnám ve struktuře chromosomu.

Strukturální přestavby dělíme na přestavby postihující jeden chromosom (delece, duplikace, inverze) nebo přestavby mezi více chromosomy (translokace).

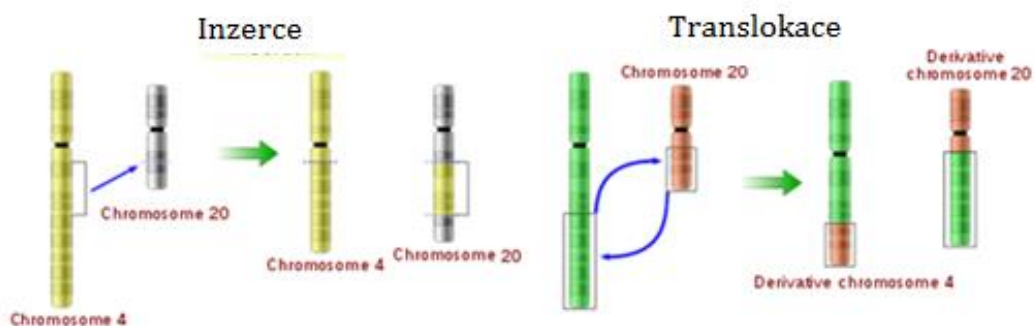
Delece neboli ztráta části chromosomu. Delece může zahrnovat koncovou část chromosomu nebo může být vmezeřena. Duplikace znamená přítomnost dvou kopií segmentu chromosomu. Duplikace, až multiplikace sehrály důležitou roli během evoluce. Inverze je přestavba chromosomu, kdy úsek je přetočen o 180°. Tato strukturální změna nenese obvykle žádné fenotypové změny (Obr. 2.5).

Nereciproká translokace je přenos úseku jednoho chromosomu na jiný chromosom. Reciproká translokace je vzájemná výměna částí nehomologních chromosomů. Translokace nemění počet chromosomů. Jsou to změny balancované, zpravidla bez fenotypového projevu, ale však mohou být pro nositele příčinou reprodukčních problémů. Jsou často diagnostikovány u párů s opakovanými potraty nebo po narození dítěte s vrozenou vadou, způsobenou chromosomální aberací.

Mutace na jednom chromosomu



Mutace mezi chromosomy



Obr. 2.5:Strukturální chromosomové změny[8]

Poměrně časté numerické i strukturální abnormality jsou příčinou spontánních potratů, neplodnosti matek starších 35 let, ale i živě narozených dětí.[1][2][3][9]

3. Analýza mitotických chromosomů

Základním principem karyotypizace chromosomu je příprava chromosomu pro mikroskopické pozorování. Zastavením buněčné mitózy v metafázi pomocí kolchicinu a napuštění buněk hypotonickým roztokem. Následuje standardní nebo fluorescenční barvení chromosomu, které jsou poté testovány za pomoci mikroskopů a počítačových programů za účelem vytvoření karyotypu a identifikaci chromosomů kvůli přítomnosti genetických vad.

Pro klasické genetické vyšetření je potřeba získat jaderné, dělicí se buňky. Běžně se získávají z periferní krve. Izolují se bílé krvinky, ke kterým se přidá antikoagulační činidlo, a poté se krátkodobě kultivuje při 37°. Během kultivace se stimuluje fytohemaglutininem mitotická aktivita. Po 72 hodinách je přidán mitotický jed kolchicin, který zastaví dělicí funkci vřeténka. Poté dochází ke kumulaci mitóz v metafázi. Další zpracování vyžaduje přidání hypotonického roztoku k sedimentu buněk a fixaci směsí metanolu a kyseliny octové. Nakapáním upraveného segmentu na podložní sklíčko je připravený vzorek na barvení a následné hodnocení.

Cytogenetické vyšetření se provádí též z kultivovaných buněk choriových klků, plodové vody nebo fetální krve a buněk dalších tkání př. národové buňky nebo fibroblastů. U buněk z kostní dřeně je možné vyšetřit bez předchozí kultivace. [1][2][6][9][10][11]

3.1 Cytogenetické metody barvení chromosomů

Obarvení chromosomů se dosahuje různými způsoby. Klasické neboli konvenční barvení chromosomů je nejčastěji pomocí Giemsova barviva. Chromosomy jsou homogenně zbarvené. Konvenční barvení umožňuje hodnotit celkový počet, hrubou stavbu chromosomů, a také při hodnocení chromosomových nebo chromatinových zlomů. Z toho obarvení nestanovíme přesný karyotyp (Obr. 3.1), ale je možné seřadit chromosomy do skupin A až G.

Pravidla pro zařazení do skupiny viz Tabulka 2

- Sestupná velikost chromosomu
- Poměr velikosti dlouhého ramínka (p) k velikosti krátkého ramínka (q)

Tabulka 2: Jednotlivý popis chromosomových skupin A až G

Skupina	Chromosomový pár	Popis
A	1-3	- Největší - Metacentrická
B	4-5	- Velké - Submetacentrická
C	6-12, X	- Středně velké - Metacentrické nebo submetacentrické
D	13-15	- Středně velké - Akrocentrické se satelity.
E	16-18	- Kratší - Metacentrické nebo submetacentrické
F	19,20	- Kratší - Metacentrické
G	21, 22, Y	- Kratší - Akrocentrické se satelity. - Chromosom Y neobsahuje satelity.



Obr. 3.1: Ukázka klasického barvení chromosomů

Mezi diferenciační barvicí techniky patří pruhování, nejpoužívanější metoda v cytogenetických laboratořích je tzv. G-pruhování. Na připravené vzorky působí krátkodobě trypsin a následně se obarví Giemsovým barvivem. Dochází ke střídání tmavých a světlých proužků po celé délce chromosomů. Pruhování vzniká v důsledku heterogenity chromatinu. Heterochromatin je zbarven tmavě. Obsahuje oblasti, které jsou bohatší na adenin a thymin, zatímco oblasti obsahující euchromatin jsou světlé, jelikož obsahují více guaninu a cytosinu. Chromosomy se pozorují pomocí světelného mikroskopu. Klasifikace chromosomů na základě G-pruhování je základem pařížské nomenklatury. Jedná se o porovnávání chromosomů s ideogramem a tvorbu karyotypu.

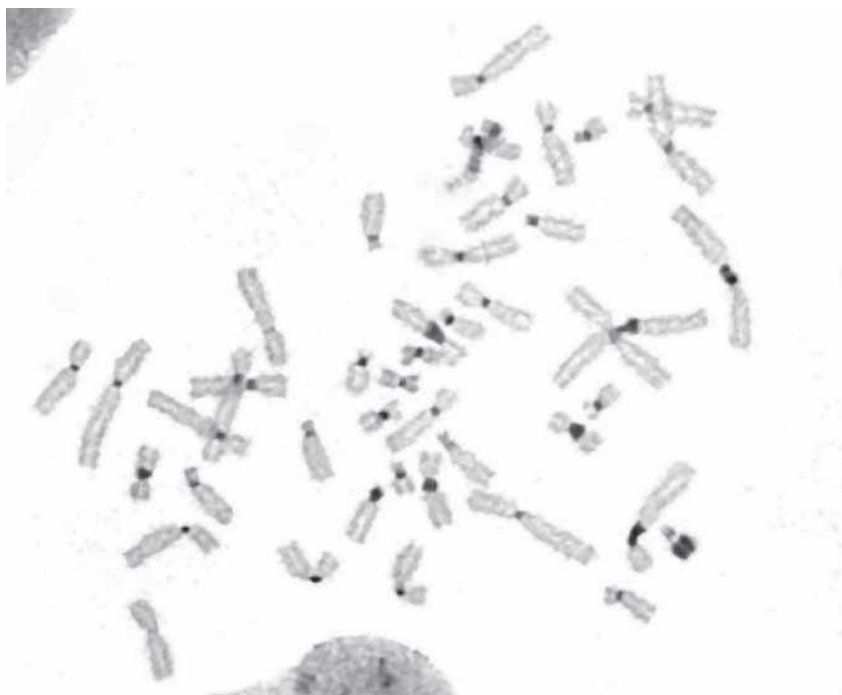


Obr. 3.2: Lidský mužský karyotyp, G-pruhování, 46 XY

G-pruhování je ve srovnání s R-pruhováním reverzní způsob barvení. Tmavé proužky se objevují v oblastech guaninu a cytosinu, a světlé proužky v oblasti adeninu a thyminu. Před barvením Giemsovým barvivem je pruhování docíleno zahřátím vzorku. Metoda vyžaduje zkušenosti a zručnost.

Barvení specifických oblastí chromosomů je např. barvení Ag-NORů, které selektivně barví satelity akrocentrických chromosomů nebo C- pruhování. Zde se využívá působení nasyceného roztoku hydroxidu barnatého. Následuje obarvení

Giemsovým roztokem, stejně jako u G-nebo R-pruhování. Zde se vizualizují oblasti konstitutivního heterochromatinu, ostatní části chromosomu jsou světlé. C-pruhování je doplňujícím vyšetřením při ověřování aberací postihující centromerickou oblast chromosomů.



Obr. 3.3: Ukázka C-pruhování[1]

Pruhy jsou viditelné ve světelném mikroskopu. Pruhovací techniky umožňují identifikovat jednotlivé chromosomy, párovat chromosomy a stanovit cytogenetické odchylky. Po získání mikroskopického snímku v digitální formě se jednotlivé chromosomy spárují a sestaví se karyotyp. [1][2][9][10][11][13]

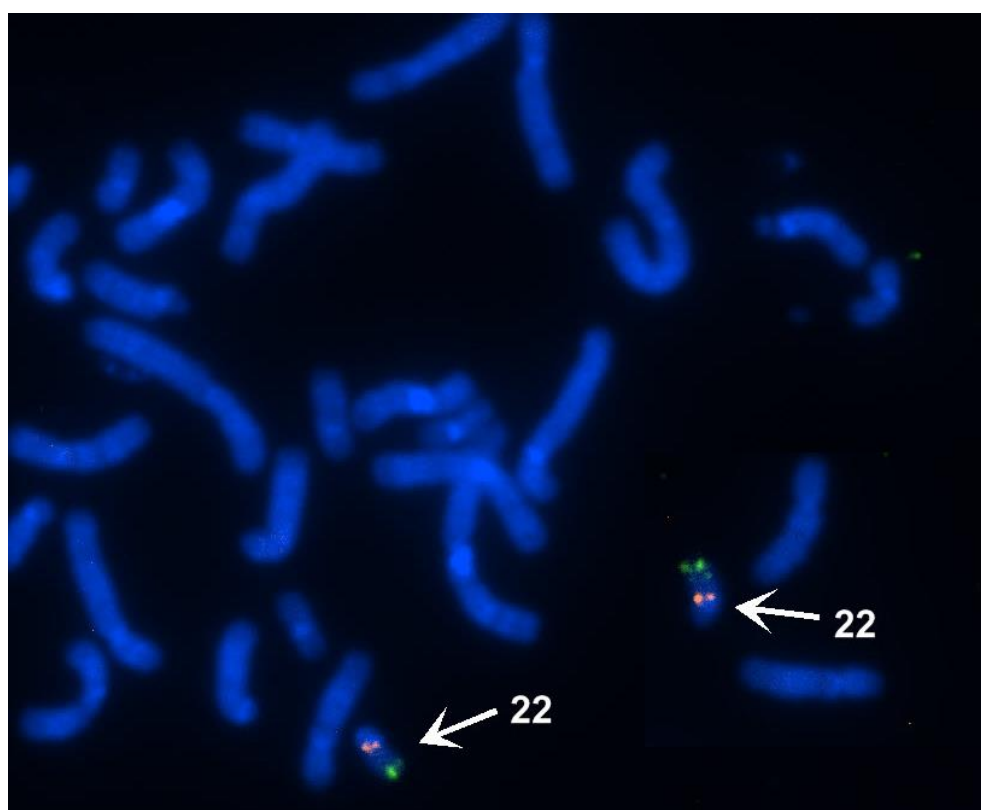
První metoda pro identifikaci všech 46 lidských chromosomů bylo Q-pruhování, která spočívá obarvení chromosomu fluorescenčním barvivem chinakrinem (Q-pruhování odvozeno z anglického názvu barviva ‚Quinecrine‘). Pozorování chromosomu je nutné pod fluorescenčním mikroskopem. Tato metoda je nejvhodnější pro zkoumání chromosomálních translokací, a to zejména pro pohlavní chromosom Y. Vzhledem k tmavému podkladu, lze rozeznat průhledné a neprůhledné pruhy. Průhledné pruhy odpovídají tmavým pruhům u G-pruhování a naopak neprůhledné světlým pruhům. [1][13]

Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) spojuje klasické genetické postupy a technologie molekulární genetiky. FISH je založená na schopnosti jednovláknové sondy DNA se vázat k cílové sekvenci denaturované DNA na základě komplementarity purinových a pyrimidinových bází. DNA sonda je předem označena fluorescenčním

barvivem a výsledný signál se analyzuje pomocí fluorescenčního mikroskopu. FISH je metoda, která se používá pro vyšetření chromosomů v mitóze nebo v interfázi.

FISH je důležitá v klinické diagnostice pro určení různých chromosomových abnormalit, včetně delecí, duplikací a translokací. Má velkou škálu využití v cytogenetice např. označení centromerů, specifikovat lokusy nebo označení celého chromosomu. Konkrétní sondy se volí podle typu vyšetření.

Na Obr. 3.4 je ukázka z fluorescenčního mikroskopu při vizualizaci chromosomu pomocí metody FISH. Důvod použití FISH byl vyloučit nebo potvrdit DiGeorgův syndrom (postihuje chromosomový pár 22). Zde jsou použity dvě sondy, první sonda je centromerická sonda, která se hybridizuje k α -satelitní DNA lokalizované v oblasti centromeru. Jedná se o červenou sondu na Obr. 3.4. Druhá použitá sonda (zelená) je lokus-specifická sonda, hybridizující specificky ke konkrétním lokusům na chromosomech. Slouží k přímé lokaci genu, k detekci jejich amplifikace a k detekci strukturálních chromosomových aberací. Při analýze se zjistilo, že pacient není postižený DiGeorgovým syndromem.[15][9][16][10]



Obr. 3.4: Ukázka metody FISH

4.Návrh a realizace algoritmu

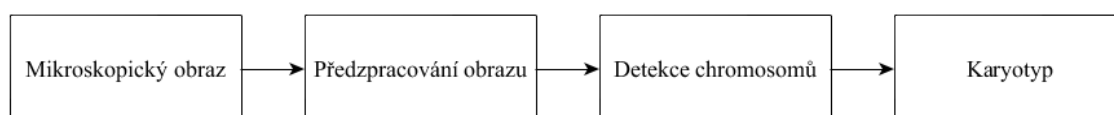
karyotypizace

Karyotypování je tradiční, přesto velmi důležitá a zároveň jediná technika založená na mikroskopii v jasném poli. Vzorek je fixován na mikroskopické sklíčko. Nejčastěji se chromosomy roztřídí a poskládají do formy karyogramu viz Obr. 2.1. Analyzovány jsou pouze obrazy metafáze odpovídající kvality.

V dřívějších letech se karyogram tvořil tak, že nasnímaný mikroskopický snímek byl vytištěn, poté ručně rozstříhán a seskládán do karyogramu. V dnešní praxi analýza chromatických snímků spočívá ve třech hlavních procesech, v nasnímání mikroskopického obrazu, zpracování a následné vyhodnocení.

Blokové schéma detekce mitotických chromosomů bylo zobrazeno na Obr. 4.1. Analýza byla prováděná na mikroskopických snímcích, získaných z Cytogenetické laboratoře v Brně. Získané snímky jsou obrazy se šedotónovými hodnotami elementů. Velikost obrazů jsou různé, záleží na rozmístění mitózy.

Ukázky postupů jednotlivých algoritmů byly prezentovány na mikroskopickém snímku (Obr. 4.2) o velikosti 575 x 588px, šedotónový formát obrazu, metoda zpracování byla G-pruhování, 46, XX chromosomů.



Obr. 4.1: Základní blokové schéma detekce mitotických chromosomů

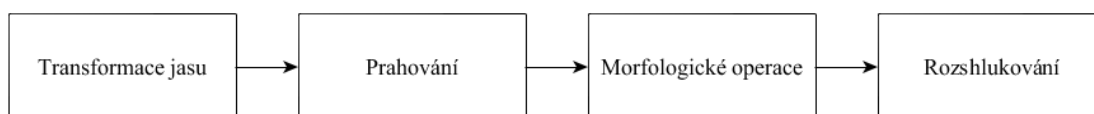


Obr. 4.2: Mikroskopický snímek, 46,XX, G-pruhování

4.1 Předzpracování obrazu

Mikroskopický obraz je matice skládající se z pixelů. Každé hodnotě pixelu odpovídá hodnota jasu v daném bodu ve scéně. Obrázek často bývá obdélníkový a může být popsán $N \times M$ m-bitovými pixely, N a M jsou počty pixelu v řádku a sloupci a 2^m udává hodnotu jasu. Podle m dostáváme rozsah hodnot jasu $0-2^m$. Nejčastěji hodnota m je 8, poté je rozsah $0-255$, 0 jsou černé pixely a 255 jsou bílé pixely, které odpovídají bílé barvě v obraze.

Prvním důležitým krokem bylo zvolit vhodné předzpracování snímků, které přispěje k lepší finální detekci. Předzpracování se skládá transformace jasových elementů, poté aplikování globální metody prahování a zpracování pomocí morfologických metod.



Obr. 4.3: Blokové schéma předzpracování obrazu

4.1.1 Transformace jasu

Na výsledný mikroskopický snímek působí mnoho faktorů, jako je správná expozice, protisvětlo a světlé části scény. Mezi jednodušší způsoby pro zlepšení subjektivního vzhledu snímku patří transformace jasu. Byla použita globální transformace jasu. Pixely původního snímku $f(x, y)$ byly transformovány na výstupní $g(x, y)$ podle vztahu:

$$g(x, y) = \frac{f(x, y) - \min(f(x, y))}{\max(f(x, y)) - \min(f(x, y))} \quad (4.1)$$

Metoda je založena na principu, že maximální a minimální hodnota jasové intenzity se počítá z celého obrazu, tím se roztáhne histogram přes celý rozsah stupňů šedi. Výsledkem byl obraz, který má zvýrazněné tmavé oblasti původního obrazu. [25]

Před samostatným prahováním obrazu byl použitý mediánový filtr pro odstranění impulzního šumu tzv. sůl a pepř. Jedná se o nelineární filtr založený na třídění velikosti jasů obrazových elementů. Využívá posunující se masku po obrazu a k výpočtu pixelu ve výstupním obrazu využívá lokální okolí pixelu ve vstupním obrazu, které je vymezeno velikostí masky. Pixely vstupního obrazu překryté maskou jsou seřazeny podle velikosti jasů a do výstupního obrazu se na pozici pod centrální prvek přiřadí mediánová hodnota masky. V našem případě byla použita maska o velikosti 7x7px.

4.1.2 Globální metody prahování

Prahování se řadí mezi jednoduché metody segmentování tvarů ze snímků. Je citlivá na světelné změny, šum a stíny ve scéně. Metoda prahování je také jednoduchá a výpočetně nenáročná.

Jako první při prahování se vykreslí histogram intenzity daného snímku. V našem případě histogram není příliš ideální, jelikož v histogramu nejsou dvě výrazné oblasti, které by se daly prahovat od pozadí snímku. Z toho důvodu byla použita níže uvedená globální metoda prahování.

Při globálním prahování byla hodnota prahu pro celý snímek konstantní. Byly vyzkoušeny dva způsoby globálního prahování. První pomocí Otsu's metody a druhý způsob globální prahování podle vzorce.

4.1.2.1 Otsu's metoda

Zde byla aplikována metoda optimálního prahu - Otsu. Metoda vychází ze statistických údajů histogramu. Výběr prahové hodnoty je založen na tom, aby obě třídy měly co nejmenší rozptyl, případně, aby rozptyl mezi třídami byl co největší (4.6).

$$\sigma_W^2(T) = \omega_0(T)\sigma_0^2(T) + \omega_1(T)\sigma_1^2(T) \quad (4.2)$$

$$\sigma_B^2(T) = \omega_0(T)\omega_1(T)(\mu_0^2(T) - \mu_1^2(T))^2 \quad (4.3)$$

Pro výpočet $\omega_0(T)$ a $\omega_1(T)$ platí vztah:

$$\omega_0(T) = \sum_{i=0}^{T-1} p(i) \quad (4.4)$$

$$\omega_1(T) = \sum_{i=T}^N p(i) \quad (4.5)$$

Hodnota p_i je hodnota relativního histogramu v jasu i , což je pravděpodobnost výskytu jasu ve snímku. T je práh a N je počet úrovní jasu.

$$T = \operatorname{argmax}(\sigma_B^2(T)) \quad (4.6)$$

Kriteriální funkce $\sigma_B^2(T)$ ve vztahu popisuje rozptyl hodnot jasu mezi třídami, a tím se dosáhne maximální separace jasových tříd. Rozptylu mezi třídami se využívá pro zjednodušení výpočtu.

Pro použití optimálního prahování - Otsu na testovací obraz byla využita z prostředí Matlab funkce `graythresh`, která je založená na zmiňované metodě. [17][18][19][20][31]

4.1.2.2 Globální prahování podle vzorce (4.7)

V prvním kroku je vykreslený histogram intenzity snímku, který má zvýrazněný kontrast a zjištěn rozložení intenzity ve snímku. Z histogramu je určena nejčastěji se vyskytující se hodnota, tato hodnota určuje počáteční práh P .

Pomocí prahu P jsou rozděleny intenzity ve snímku na dvě skupiny. U obou vzniklých skupin jsou vypočítány jejich střední hodnoty μ_1 a μ_2

Vypočítání nového prahu P_n je proveden pomocí vzorce:

$$P_n = \frac{1}{2}(\mu_1 + \mu_2) \quad (4.7)$$

Prahování snímku se provede s nově získaným prahem P_n . Hodnoty menší než práh, jsou rovny 1 a hodnoty větší než práh jsou rovny 0, tzv. pozadí. Výstupem je nový naprahovaný binární snímek.

Pro navrženou detekci byla použita tato realizace globálního prahování, ukázka výsledku (viz Obr. 4.4)

Obráz po zvýraznění kontrastu



Obráz po prahování



Obr. 4.4: Obrázky po transformaci jasu a prahování

4.1.3 Morfologické úpravy

Před aplikací morfologické operace, byly chromosomy seřazeny podle obsahu a poslední vzorek byl testován, zdali byl detekován chromosom nebo nečistota. Byla využita vlastnost nejmenších chromosomů - jejich obsahy jsou poměrně stejné velikosti.

Poté byl stanoven rozhodovací práh, viz vzorec (4.7). Pokud byla splněná prahová podmínka, jednalo se o chromosom, pokud ne, byla detekována nečistota, která byla následně odstraněna (Obr. 4.5).

$$P_{nečistota} = \tau - \frac{\tau}{3} \quad (4.8)$$

kde $P_{nečistota}$ je rozhodovací prahová hodnota a τ je průměrná hodnota z posledních čtyř seřazených vzorků chromosomu.



Obr. 4.5: Odstranění nečistoty, která byla detekována jako chromosom

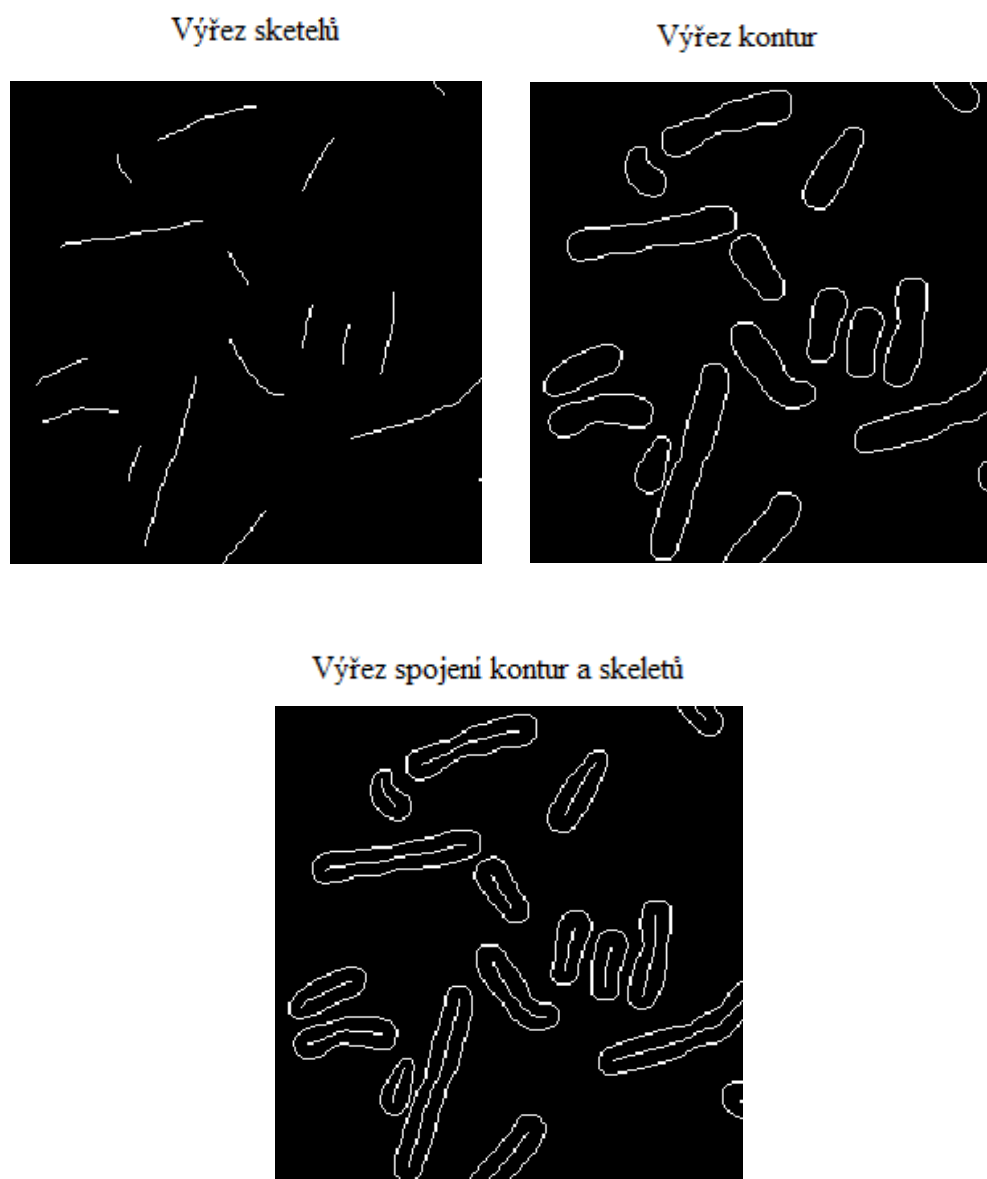
Na snímku zbavených nečistot byla provedena indexace jednotlivých oblastí, kde v ideálním případě vznikne 46 oblastí, které odpovídají 46 chromosomům. Dále byly aplikovány morfologické operace pro získání kontur a skeletonu jednotlivých oblastí.

Morfologické transformace binárních obrazů poskytují bližší informace o tvaru nebo počtu objektů v obraze. Základ morfologických operátorů jsou strukturální elementy, které se pohybují po binárním obraze. Strukturální element má referenční bod, pod jehož pozici se ukládá výsledek morfologické operace. Referenční bod může být jakýkoliv prvek ze strukturálního elementu, který do značné míry ovlivní výsledek morfologické operace.

První použitou morfologickou operací byla skeletonizace, která poskytuje tzv. centrální linii neboli skelet objektu v obraze. Skelet představuje linii, která lokálně koresponduje se středem objektu a poskytuje informaci o jeho tvaru. Byl použitý algoritmus pro iterativní ztenčování objektu, který odebírá jednotlivé pixely po obvodu objektu. Algoritmus se zastaví, jakmile je centrální linie široká 1px.

Další morfologickou operací byly vytvořeny kontury jednotlivých objektů. Vytvoření kontury spočívá v odstranění vnitřních pixelů. K odstranění pixelu dojde, když jsou 4-spojité sousední pixely rovny jedné, přičemž se zachovávají pouze okrajové body, které tvoří konturu objektu širokou 1px. [31]

Na Obr. 4.6 vidíme spojení obrazu s konturami a skeletony, kde bylo nutné dopočítat délku skeletu až ke kontuře. Zkrácení skeletonu bylo z důvodu ztenčování objektu. Z toho plyne další krok detekce viz 4.1.4.



Obr. 4.6: Morfologické operace

U skeletů jednotlivých objektů byly dále zjišťovány počty koncových bodů, které byly hlavním parametrem při rozlišení, zdali se nejedná o samostatný chromosom nebo shluky - překrývající se chromosomy. Základní předpoklady pro třídění chromosomů jsou uvedeny v tabulce 3. V ukázkovém snímku (Obr. 4.2) v každém objektu byly nalezeny pouze dva konce, proto byly vyhodnoceny jako samostatné chromosomy.

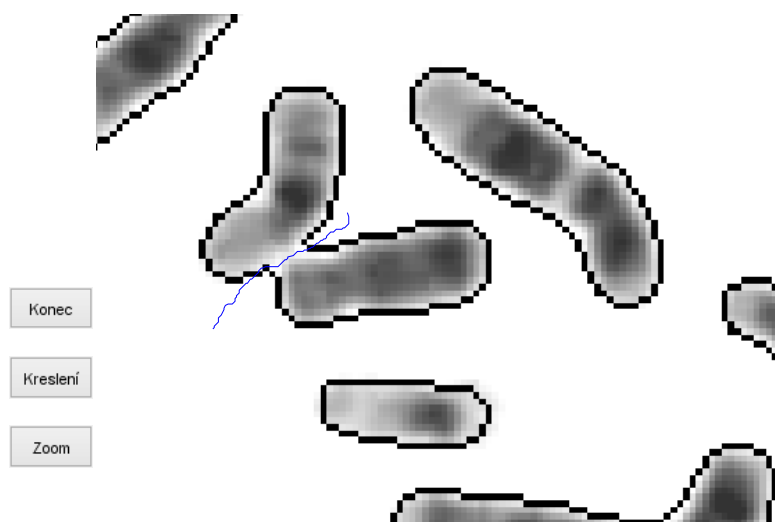
Tabulka 3: Základní předpoklady pro třídění chromosomu podle počtu konců

Počty konců	Počty chromosomu
2	1
3-4	2
5-6	3
7-8	4

4.1.4 Rozshlukování

Jestliže bylo v předchozím kroku při zjišťování počtů konců vyhodnoceno, že snímku obsahuje shluky, následuje rozshlukování. Na rozdělení shluku byly použity dvě metody. První pro rozdělení přiléhajících chromosomů a druhá metoda pro chromosomy, které se překrývají.

Pokud byly chromosomy detekovány, že leží vedle sebe, bude uživatel vyzván, aby jednotlivé shluky rozdělil pomocí připravené funkce. Pro zvýšení přesnosti při rozdělování shluk byla v uživatelském rozhraní přidána funkce Zoom. Druhou funkcí Kreslení dojde k samotnému rozdělení shluku. Pomocí kurzoru myši se zakreslí hranice, kde mají být shluky rozděleny. Zakresluje se do původního obrazu (Obr. 4.7) s vyznačenými konturami. Po úpravě obrazu vznikne binární obraz s rozdělenými chromosomy (viz Obr. 4.8).



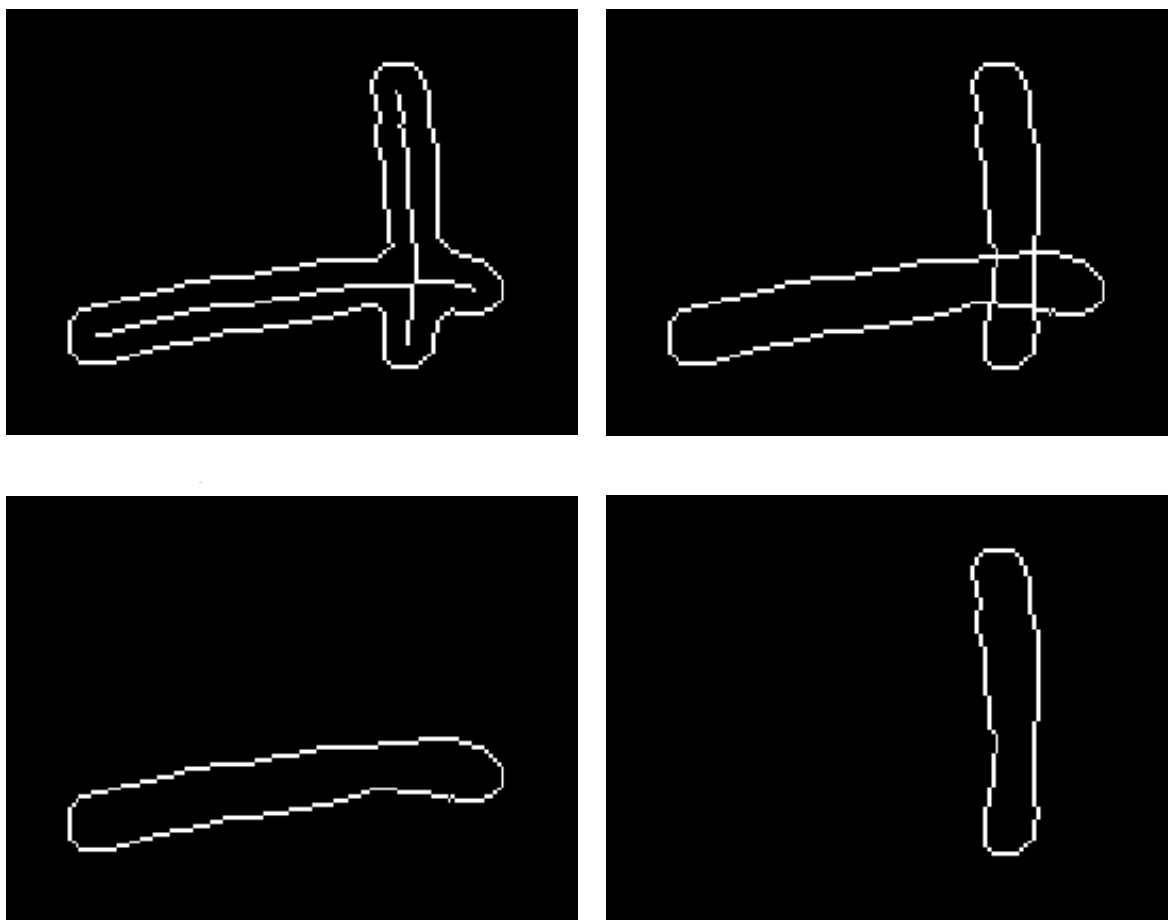
Obr. 4.7: Obraz s vyznačenou hranicí rozdělení chromosomů



Obr. 4.8: Binární obraz s rozdělenými chromosomy

Druhá metoda byla využita při rozdělování chromosomů, které se překrývaly (Obr. 4.9). Postup rozdělování chromosomu závisí na postupném segmentování shluku. [27][30]

1. Určit průsečíky ve skeletu shluku.
2. Vyhledat nejbližší body od průsečíku ke kontuře chromosomu: hledání nejbližších bodu bylo pomocí kružnice, která zvětšovala svůj poloměr, dokud nenašla v daném kvadrantu bod kontury. Celkem byly vyhledány čtyři body, které tvořily hranice.
3. Spojení bodů vertikálních: byl znovu vypočítán skelet pro samostatný chromosom.
4. Spojení bodů horizontálních: opět byl vypočítán skelet pro daný chromosom.



Obr. 4.9: Rozshlukování chromosomů

Dále byly dopočítané skeletony. Počítaly se stejným způsobem jako u jednotlivých chromosomů.

Algoritmus byl ošetřený i pro případ pokud by shluk tvořil tři překrývající se chromosomy. Pokud byly nalezeny dva průsečíky, postupovalo se obdobně jako v předchozím případě. Vzniklo pět obrazů (Obr. 4.10), první obraz obsahoval jeden chromosom (A), druhý obraz byl shluk z dvou chromosomů (BC), třetí obraz byl shluk dvou chromosomů (AB), čtvrtý obraz obsahoval pouze samostatný chromosom (C). Po vynásobení obrazů z nově vzniklých shluků (AB a BC) byl osamostatněn třetí chromosom (B). Vzniklé samostatné chromosomy byly dále zpracovány stejně jako předchozí samostatné chromosomy.

Shluk tří chromosomů (ABC)



Shluk dvou chromosomů (AB)



Shluk dvou chromosomů (BC)



Chromosom (A)



Chromosom (C)



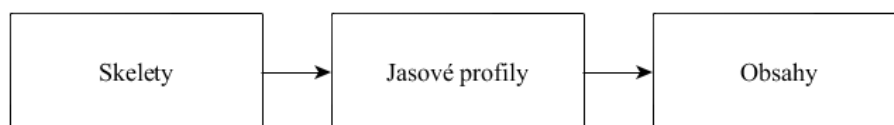
Chromosom (B)



Obr. 4.10: Postupné rozshlukování chromosomů

4.2 Detekce chromosomů

Následující část byla složená z dopočítání skeletu ke konturám objektů a tím vznikl jeden z parametrů pro vyhodnocování karyotypu. Dále byl vypočítán jasový profil ve 2D a 1D rozměru a jako poslední z parametrů byl vypočítán obsah jednotlivých chromosomů.



Obr. 4.11: Blokové schéma detekce chromosomů

4.2.1 Skelety

V tomto kroku bylo hlavní úlohou dopočítat koncové body jednotlivých skeletů ke konturám objektů. Na Obr. 4.6 můžeme vidět spojení skeletů s danými konturami, kde následně vznikly oblasti, ve kterých chyběly úseky skeletu. Pro dopočítání chybějícího skeletu byly vyzkoušeny dva postupy. První postup byl založený na vyhledávání zpětného pixelu v dané masce a druhý postup spočíval ve výpočtu úhlů s následujícími body [25].

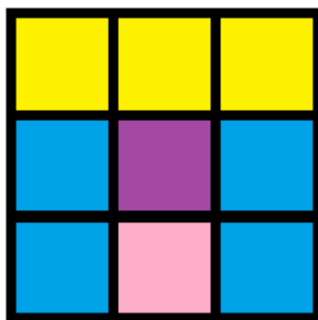
4.2.1.1 Vyhledávání zpětného pixelu v dané masce

Byly k dispozici souřadnice všech pixelů jednotlivých skeletů. Prvním cílem bylo najít dva koncové body pro každý chromosom.

Jakmile byl určen koncový bod, byla na binárním obraze skeletu aplikována maska o velikosti 3x3px, kde centrálním prvkem byl zmíněný koncový bod (fialový čtverec). Poté byla zjišťována pozice pixelu v masce, který předcházel koncovému bodu (růžový čtverec), nalezený bod byl prvním kritériem pro hledání následujícího bodu skeletů. Jedno z kritérií bylo, že nově nalezený bod se nesmí dotýkat předcházejícího koncového bodu (modré čtverce). Z toho bylo usouzeno, že nový bod bude na pozici ve žluté oblasti, viz Obr. 4.12

Postup pro zjištění následujícího pixelu byl:

1. Ke každému pixelu ve žluté oblasti byly nalezeny hraniční pixely kontury (v ose x a v ose y).
2. Z nalezených dvou hraničních pixelů kontury byla vypočítána středová hodnota. Tím pádem bylo získáno šest teoretických nových pixelů.
3. Určit nový bod skeletu neboli nový koncový bod z vypočítaných šesti teoretických pixelů, kde rozhodovalo, jestli leží ve žluté oblasti masky.
4. Algoritmus byl optimalizován na všechny směry a ukončený jakmile se skelet dotýkal kontury.



Obr. 4.12: Ukázka principu dopočítávání úseků skeletu

4.2.1.2 Výpočet úhlů z následujících bodů

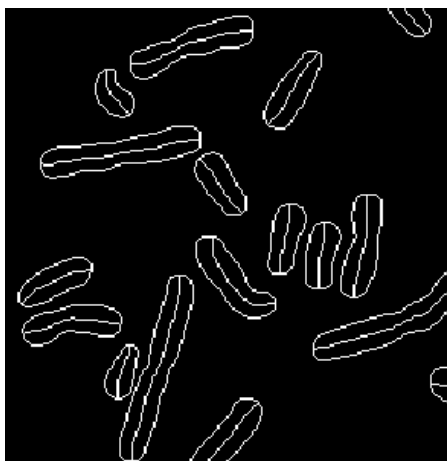
Při druhé metodě na dopočítávání skeletu byla využita opět maska o velikosti 3x3px. Metoda byla založená na výpočtu úhlů mezi určitým bodem ve skeletu a všech osmi body v masce, centrální bod masky byl koncový bod skeletu. Bylo vypočítáno osm úhlů a výsledný nový koncový bod byl ten, který svíral největší úhel s určitým bodem ve skeletu. Úhly byly vypočítány podle vzorce:

$$\cos(\alpha) = \left(\frac{X_n * NX_m + Y_n * NY_m}{\sqrt{X_n^2 + Y_n^2} + \sqrt{NX_m^2 + NY_m^2}} \right) \quad (4.9)$$

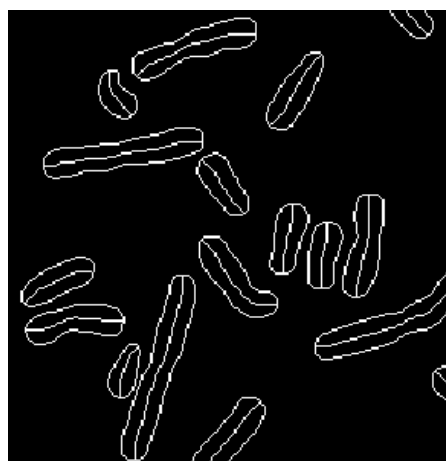
$$NKB = \max(\alpha) \quad (4.10)$$

kde X a Y jsou souřadnice n-tého bodu ve skeletu, v našem případě n=7, NX a NY jsou teoreticky nové souřadnice koncového bodu, m=1,2...8, NKB nový koncový bod je maximální úhel (α) mezi určeným bodem ve skeletu a bodem v masce.

Dopočítané skelety (1. metoda)



Dopočítané skelety (2. metoda)



Obr. 4.13: Ukázka dopočítání skeletů pomocí dvou metod

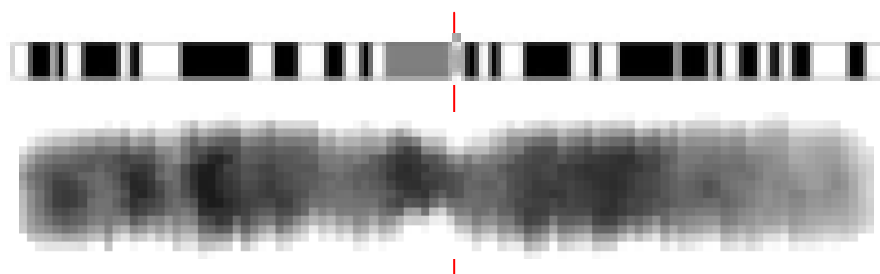
V porovnání obou metod byly dosaženy relativně stejné výsledky. Ve výsledném programu byl zvolený druhý algoritmus pro dopočítávání konců, z důvodu menší výpočetní náročnosti. Jakmile byly dopočítány celkové délky skeletu, tím vznikl nový parametr - celková velikost jednotlivých chromosomů.

4.2.2 Jasový profil

Pro získání jasového profilu z celé délky a šířky chromosomů, bylo důležité znát všechny pixely jednotlivých skeletů a pixely, které tvoří chromosom. Skelet tvořil 1D rozměrný signál, který procházel středovou linií chromosomu. Jelikož chromosomy byly nerovnoměrně nabarveny, musely být vytvořeny jasové profily z celé šířky chromosomu tzv. jasový profil s 2D rozměry. Jedním z výsledků jasového profilu ve 2D rozměru bylo, že daný chromosom byl narovnan. Po získání jasových profilů ve 2D rozměru byly vypočítány mediánové hodnoty, pro jednotlivé pixely skeletu z celé šířky chromosomu.

Postup získání jasové profilu: z předchozího kroku byly využity dopočítané délky skeletu. Na každý pixel skeletu byla počítána kolmice, která procházela celou šířkou chromosomu. Souřadnice kolmic na skelet byly dopočítány rasterizací úsečky, pomocí DDA algoritmu. Po získání pozic souřadnic pro jednu kolmici, byly pozice vyhledány v šedotónovém obraze a zapsány jejich jasové hodnoty do matice. Výsledná matice s narovnanými chromosomy neboli s jasovými profily ve 2D rozměru, byla dimenzionálně závislá na počtu detekovaných chromosomů.

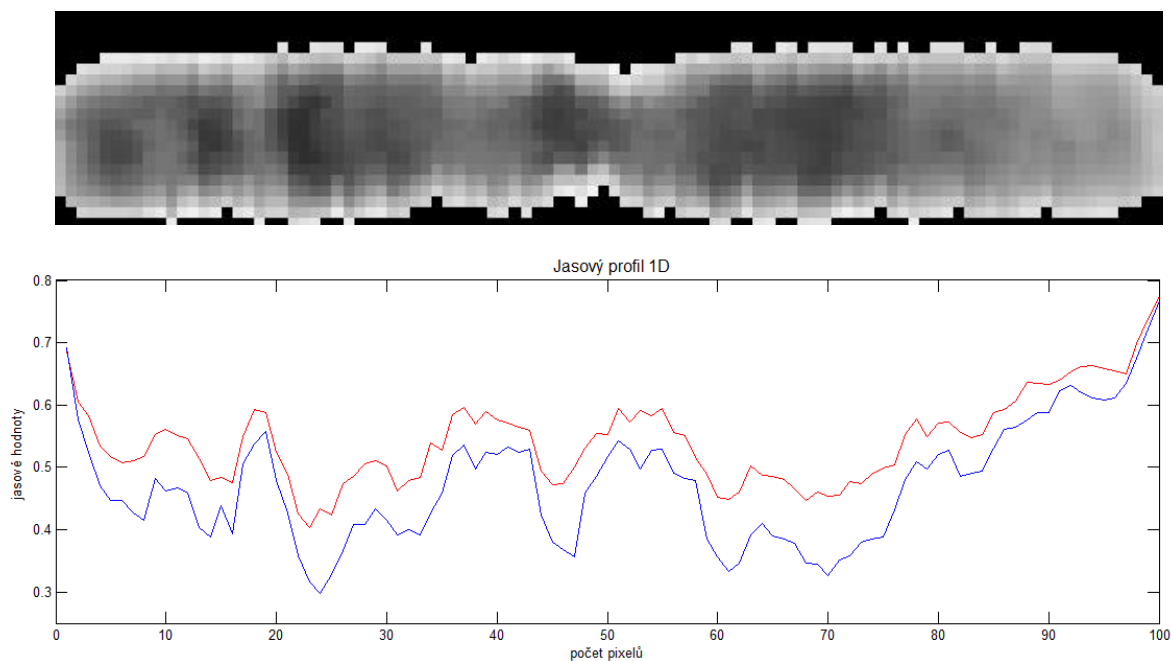
Jasový profil ideogramu a detekovaného chromosomů



Obr. 4.14: Ideogram a jasový profil chromosomu

Porovnání jasového profilu s ideogramem je zobrazeno na Obr. 4.14, kde v oblasti červené linie se nachází centromera. Na jasovém profilu můžeme vidět, že některé pruhy odpovídají ideogramu, ale jejich přechod z oblastí světlý do tmavých nebo naopak jsou velmi neostré. Proto některé pruhy splývají a jeví se jako jeden pruh.

Pro převedení jasového profilu z 2D do 1D jasového profilu, byla v každém řádku matice vybírána mediánová hodnota a také průměrná hodnoty v každém řádku matice (viz Obr. 4.15).



Obr. 4.15: Jasové profily

Na Obr. 4.15 je znázorněný jasový profil ve 2D a 1D prostoru, kde lokální minima v 1D rozměru odpovídají tmavým proužkům ve 2D rozměru. U 1D rozměru jsou znázorněny dvě křivky a to pro výběr mediánu (modře) a pro výběr průměrné hodnoty (červeně). Znázornění 2D jasového profilu bylo otočené o 90° pro názornější vysvětlení 1D jasového profilu.

Výsledná klasifikace chromosomů vychází z 1D jasových profilů (viz dále).

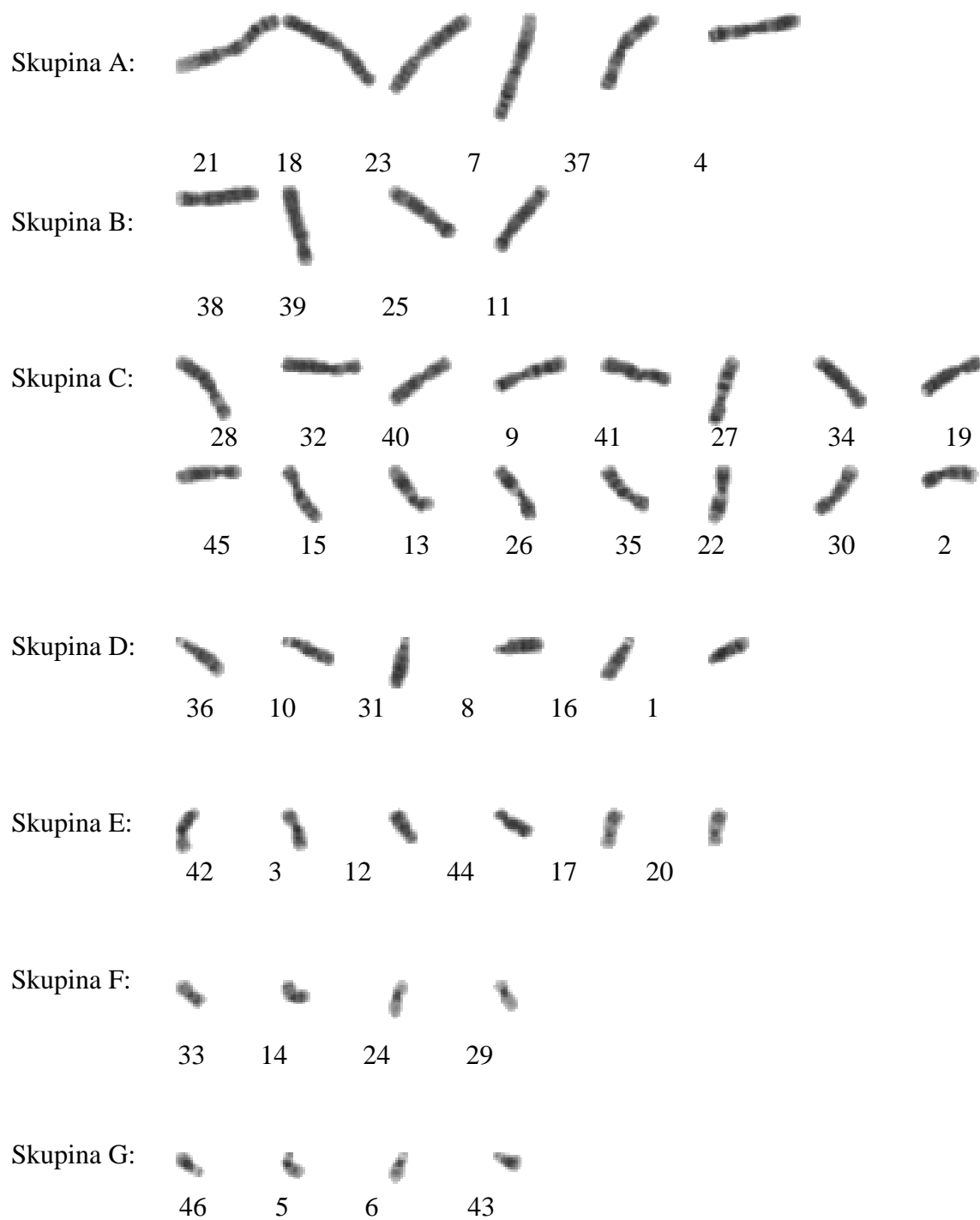
4.2.3 Obsah chromosomů

Obsahy chromosomů byly vypočítány jako oblasti, které daný chromosom zaujal v obraze. Vycházelo se z binárního obrazu, kde byly jednotlivé oblasti indexovány. Indexy byly závislé na počtu oblastí v obraze.

Suma jednotlivých indexů vyjadřovala počet pixelů, kterými byl tvořen obsah chromosomu. Obsah chromosomů se ukázal jako hlavní parametr pro třídění chromosomů do tříd A až G. Na Obr. 4.16 je vidět rozřazení chromosomů dle vypočítaného obsahu a zároveň jsou rozřazeny do jednotlivých skupin. Dále binární

oblasti byly převedené na původní stupně šedi a dalším krokem bylo najít jednotlivé páry chromosomů.

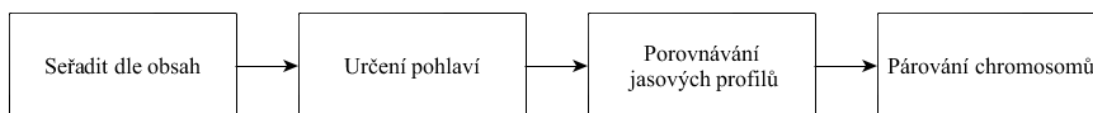
Rozdělení chromosomů podle obsahu



Obr. 4.16: Seřazené chromosomy podle obsahu

4.3 Karyotyp

Po získání všech důležitých parametrů – délka, obsah a jasové profily. Bylo provedeno samostatné vyhodnocování karyotypu. Postupovalo se podle blokového schématu na Obr. 4.17



Obr. 4.17: Blokové schéma postupu vyhodnocování párů

Chromosomy byly seřazeny sestupně dle obsahu (viz 4.2.3). Po seřazení bylo důležité rozhodnout, jestli se jedná o mitózu mužského nebo ženského pohlaví, z důvodu nastavení dalšího výpočtu. Ženské pohlaví má zastoupeny ve skupině C dva stejně dlouhé pohlavní chromosomy, oproti tomu mužské pohlaví má jeden pohlavní chromosom ve skupině C a druhý ve skupině F. Porovnávání vzájemných 1D jasových profilů bylo zvoleno v rámci jednotlivých skupin. Pouze výjimku tvořily skupiny A a B, které byly vzájemně porovnávány a následně rozděleny zpátky do skupiny dle průměrného obsahu obou chromosomů.

Pro porovnávání jednotlivých jasových profilů byly vyzkoušeny tři metody na vyhodnocení podobnosti mezi jednotlivými s chromosomy. Metody vyhodnocení byly založené jasové intenzitě s různým kritériem. Dané kritéria byly – korelace, kosinové kritérium a euklidovská vzdálenost.

Korelace představuje vzájemný vztah mezi dvěma signály. Míra korelace je dána tzv. korelačním koeficientem „r“ v rozsahu $<-1, 1>$, čím větší je absolutní hodnota „r“, tím jsou si signály podobnější.

$$r = \frac{\sum_m \sum_n (A_{mn} - \bar{A})^2 (B_{mn} - \bar{B})^2}{\sqrt{(\sum_m \sum_n (A_{mn} - \bar{A})^2) (\sum_m \sum_n (B_{mn} - \bar{B})^2)}} \quad (4.1)$$

kde r je korelační koeficient a \bar{A} , \bar{B} jsou průměrné hodnoty A a B.[31]

Euklidovská vzdálenost prezentuje vzdálenost dvou bodů, jejichž souřadnice jsou v N prostoru určeny prvky a a b nebo kosinus úhlu, který svírají průvodiče těchto bodů.

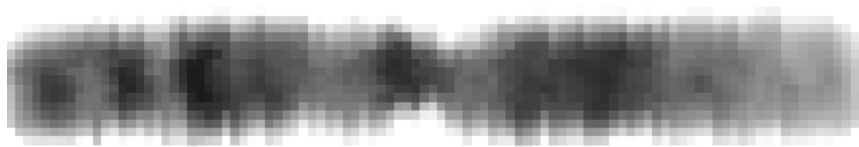
$$C_E(a, b) = |a - b| = \sqrt{\sum_{i=1}^N (a_i - b_i)^2} \quad (4.2)$$

$$C_A(a, b) = \frac{ab}{|a||b|} = \frac{\sum_{i=1}^N a_i b_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^N a_i^2} \sqrt{\sum_{i=1}^N b_i^2}} \quad (4.3)$$

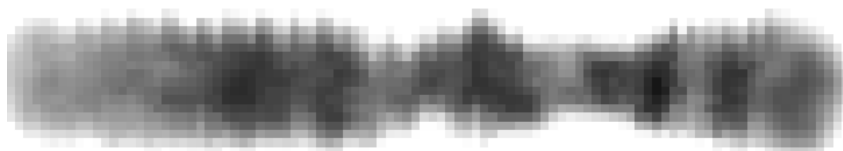
Euklidovská vzdálenost (4.2) dvou totožných vektorů je nulová a se zvyšující odlišností vektoru je její hodnota vyšší. Kosinové kritérium (4.3) může nabývat hodnot y intervalu $\langle 0, 1 \rangle$, kde hodnota jedna vyjde při identických vektorech, které svírají nulový úhel, jehož kosinus je jedna [25][29].

Jelikož délky jednotlivých chromosomů nebyly stejně dlouhé, byl algoritmus nastavený, tak že se ve skupině vybere nejdelší chromosom. S daným chromosom byly porovnávány jednotlivé chromosomy, které se postupně posunovaly od začátku nejdelšího chromosomu ke konci, aby došlo k posouzení podobnosti v celém chromosomu. Jakmile byly zjištěny všechny podobnosti s prvním chromosomem, postupovalo se stejným způsobem, aby se zjistili všechny vzájemné podobnosti. Problém nastal, pokud chromosom byl v obraze detekován otočený o 180° vůči druhému chromosomu v páru. Při porovnání byl špatně zařazen do párů, jelikož pruhození chromosomu není symetrické. Proto byl jasový profil zrcadlově otočený a porovnaný stejným způsobem jako původně detekovaný jasový profil.

Jasový profil – chromosom č. 7

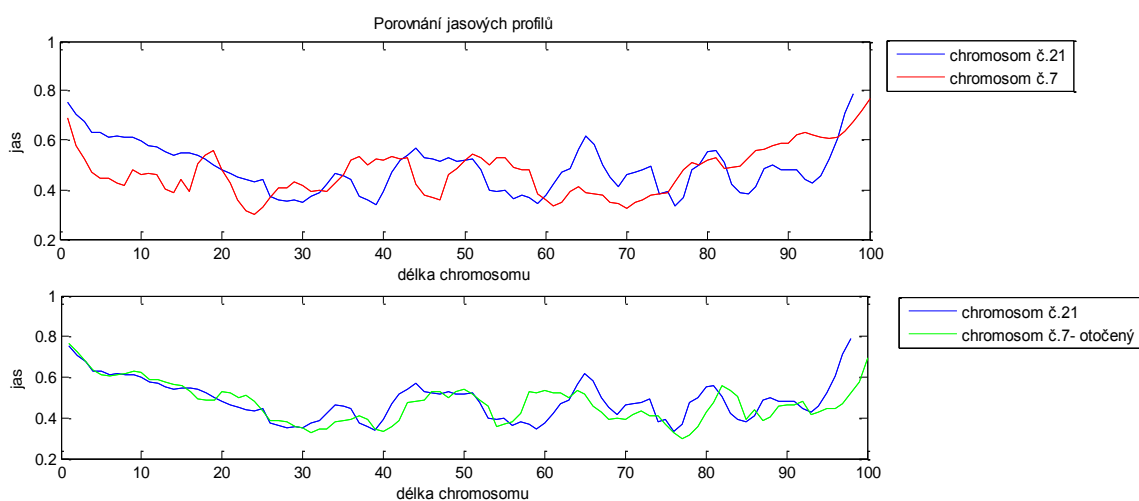


Jasový profil – chromosom č. 21



Obr. 4.18: 2D jasový profil porovnávaných chromosomů

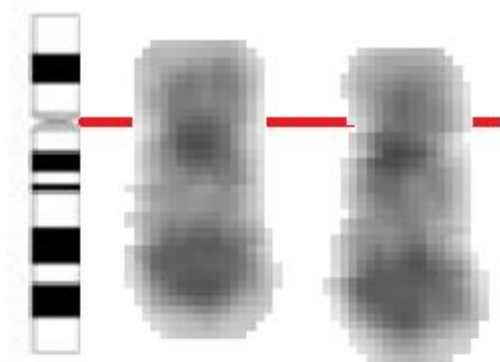
Na Obr. 4.18 jsou znázorněné 2D jasové profily chromosomového páru ze skupiny A. Můžeme vidět, že ve směru detekce se chromosomy příliš nepodobají z hlediska jasů, ale pokud se jeden chromosom otočí, jejich podobnost je dostačující aby byly uznány za pár. V grafickém znázornění (na Obr. 4.19) modrá křivka představuje chromosom č. 7 z předchozího obrázku. Červená a zelená křivka jsou jasové profily chromosomu č. 21. Červená představuje původní jasový profil, který byl získán z obrazové analýzy, otočený profil o 180° znázorňuje zelená křivka.



Obr. 4.19: Grafické srovnání jasových profilu chromosomu

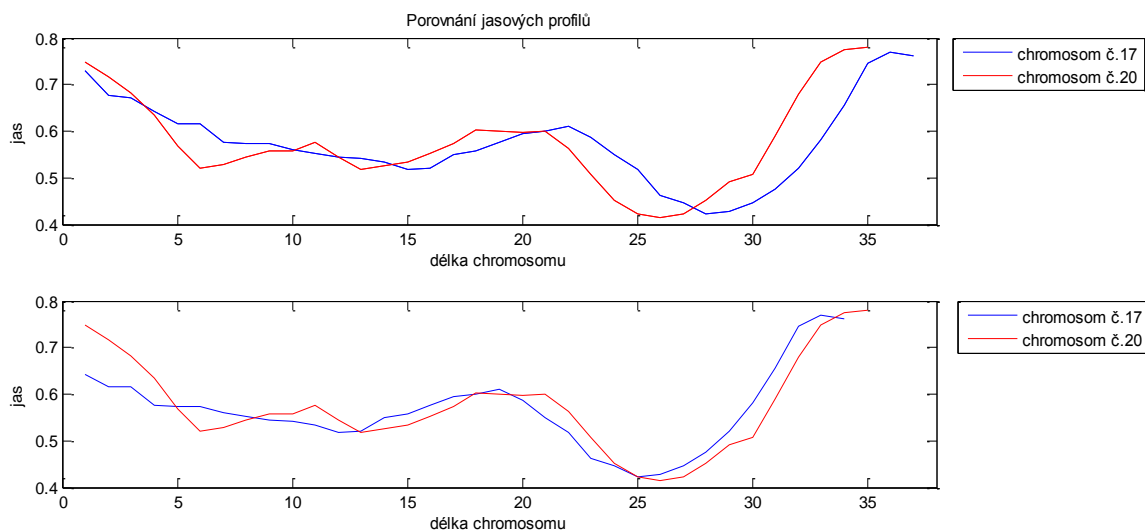
Vzájemné hodnoty podobnosti chromosomů byly vypočítány pro oba směry natočení jednotlivých chromosomů ve skupině. Poté se hledaly maximální hodnoty podobností u metod s použitím výpočtu korelace nebo kosinové kritéria. V případě Euklidovské vzdálenosti se hledaly minimální hodnoty. Jakmile byla nalezena hodnota podobnosti, byly určeny chromosomy, které tvoří pár. Dané chromosomy, které se podílely na dalších hodnotách podobnosti, byly smazány, aby se nevyskytoval daný chromosom víckrát ve vyhodnocení.

Ideogram Chromosom č. 17 Chromosom č. 21



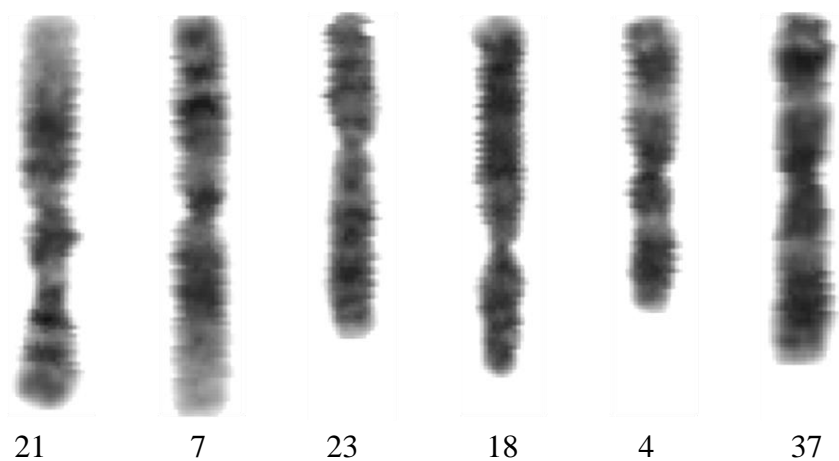
Obr. 4.20: Chromosomový pár s ideogramem páru č.17

Na Obr. 4.20 je chromosomový pár, který měl největší podobnost ve všech třech metodách pro vyhodnocování podobnosti chromosomových párů. Dále na obrázku můžeme vidět porovnání daného páru s ideogramem. Oblast centromery je vyznačená červenou linií. Přechody mezi jednotlivými pruhy nejsou tak zřetelné jak u ideogramu, některé pruhy nejsme schopni rozeznat. Chromosomy byly detekovány ve stejném směru (viz Obr. 4.21). Zde byla výhoda ve vyhodnocování, že byly srovnávány chromosomy postupně v celé délce, protože největší podobnosti byla při čtvrtém posunu v délce.



Obr. 4.21: Jasový profil chromosomů č. 17 a č. 20

Na Obr. 4.22 jsou znázorněné narovnané chromosomy, přiřazené do párů chromosomů ve skupině A. Můžeme vidět, že první a druhý chromosomový pár je detekován v obraze s odlišnou směrovostí, kdežto třetí pár má stejný směr. Dále je vidět odlišnost v pruhování mezi jednotlivými páry. Klasifikace byla v daném příkladu pomocí kosinového kritéria. Celkové zobrazení karyotypu viz na Obr. 5.3



Obr. 4.22: Výsledek přiřazení chromosomu ve skupině A

5. Vyhodnocování tvorby karyotypu

Navržený algoritmus byl testován na několika mikroskopických snímcích, které byly pořízeny z Cytogenetické laboratoře v Brně.

V první části algoritmu dochází k předzpracování mikroskopického snímku za použití transformace jasu, práhování a morfologických operací. V této části algoritmu došlo k převedení šedotónového obrazu na binární obraz a vymezení oblastí, se kterými bylo dále pracováno. V některých případech při práhování došlo ke ztrátě informace v důsledku, špatného určení prahu. Ztráta se vyskytovala převážně u akrocentrických chromosomů, v tomto případě docházelo k uměle navyšování počtu detekovaných chromosomů.

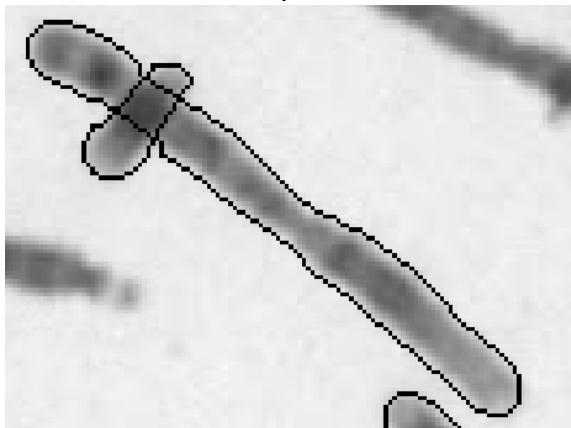
Morfologické operace byly jedny z hlavních operací celého algoritmu. Jak bylo uvedené v předchozí kapitole, důležité bylo získat kontury, skelety a oblasti jednotlivých chromosomů.

Po získání důležitých parametrů – obsah, délka a jasové profily, bylo pomocí kombinací daných parametrů provedené vyhodnocování karyotypu.

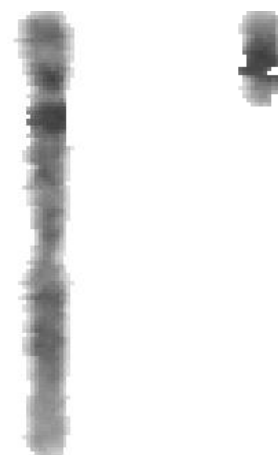
Jelikož v mikroskopických snímcích se vyskytovaly chromosomy, které zaujímaly různě stočené pozice, ležely poblíž sebe anebo se překrývaly. Tím docházelo ke snižování účinnosti algoritmu. Ukázky dvou nepřesností jsou znázorněny na Obr. 5.1 a Obr. 5.2.

Na prvním obrázku, kde se chromosomy v původním obraze překrývají, po aplikování funkce pro rozshlukování, v místě překryvu dochází ke zvýšení hodnoty jasu. Zde není možné jednoznačně určit, kterého chromosomu jsou jasové hodnoty. Oproti tomu na Obr. 5.2, vlivem stočení chromosomu dochází při jeho narovnání ke zkreslení hodnot v ohybu.

Shluk chromosomů v původním obraze

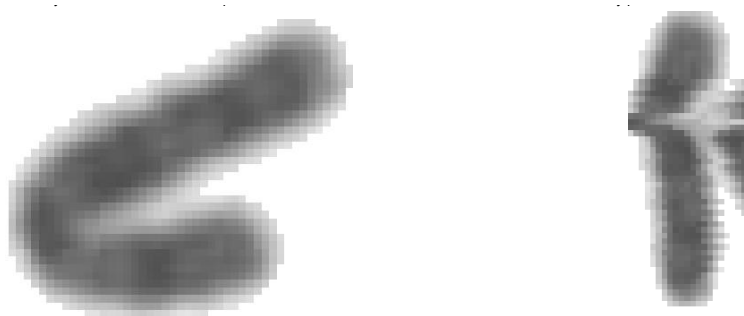


Rozshlukování chromosomů



Obr. 5.1: Chromosomový shluk, jasové profily daného shluku

Chromosom č. 34



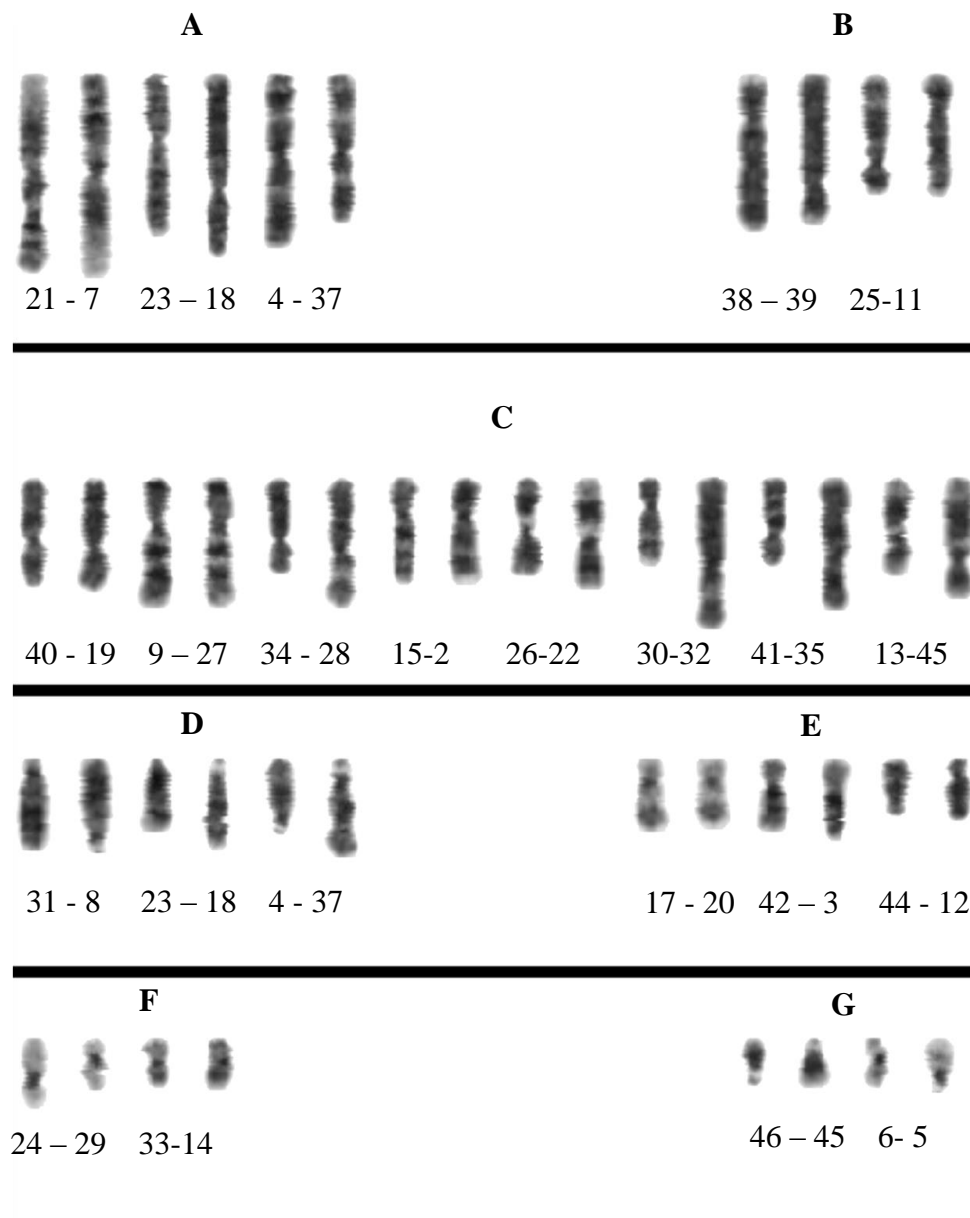
Obr. 5.2: Ukázka nepřesného převedení detekovaného chromosomu na jasový profil

- Vyhodnocení ukázkového obrázku (Obr. 4.2)

V obrázku bylo detekováno 46 oblastí, které odpovídaly jednotlivým chromosomům. Žádné oblasti se nepřekrývaly ani nebyly výrazně stočeny. Celkové rozřazení chromosomů do páru na základě obsahu a následného porovnání jasových profilu je znázorněné na Obr. 5.3, jednalo se o ženský karyotyp. Jsou uvedeny čísla chromosomu, jak byly očíslovány v průběhu algoritmu. V příloze jsou dále uvedeny výsledky zobrazující vyhodnocení pomocí kosinového kritéria a Euklidovské vzdálenosti.

V tabulce 4 jsou zapsány chromosomy, které tvoří pár z ukázkového obrázku (Obr. 4.2). Barevnost tabulky určuje velikosti skupin. Výsledky jsou uvedené z vyhodnocení pomocí podobnostních kritérií – korelace, kosinové kritérium a euklidovská vzdálenost, v posledním sloupci jsou uvedeny správně přiřazené páry chromosomů. Vyčíslená úspěšnost je vztažena k celkové skupině ne ke konkrétním párům chromosomů. Vyhodnocování na základě korelace a kosinového kritéria byly poměrně na stejné úrovni, na rozdíl od euklidovské vzdálenosti, která častěji nesprávně spojila chromosomové páry.

Ženský karyotyp



Obr. 5.3: Výsledný ženský karyotyp z Obr. 4.2

Znázorněné chromosomy byly seřazeny podle výsledku párování pomocí korelace. Vytvořené chromosomové páry pomocí algoritmu se od správně přiřazených lišili pouze v některých párech ve skupině C.

Tabulka 4: Výsledky párování chromosomů – z Obr. 4.2, 46,XX

	Korelace	Kosinové kritérium	Euklidovská vzdálenost	Ručně
1.	21-7	21-7	7-21	21-7
2.	23-18	23-18	4-18	23-18
3.	4-37	4-37	37-23	4-37
4.	39-38	39-38	39-38	39-38
5.	25-11	25-11	25-11	25-11
6.	40-19	35-13	28-41	28-32
7.	9-27	27-9	27-9	27-9
8.	34-28	34-28	34-32	34-19
9.	15-2	30-32	30-35	30-2
10.	26-22	15-2	15-2	35-15
11.	30-32	26-22	13-26	26-22
12.	41-35	45-41	45-19	45-13
13.	13-45	40-19	40-22	40-41
14.	31-8	31-8	31-8	31-8
15.	36-1	36-1	36-10	36-1
16.	16-10	16-10	1-16	16-10
17.	42-3	42-3	42-3	42-3
18.	17-20	17-20	20-17	17-20
19.	44-12	44-12	44-12	44-12
20.	24-29	24-29	24-14	24-29
21.	33-14	33-14	33-14	33-14
22.	46-43	46-43	46-43	46-43
23.	6-5	6-5	6-5	6-5
Správných párů	18	17	12	23
Úspěšnost [%]	78,2	73,9	52,2	100

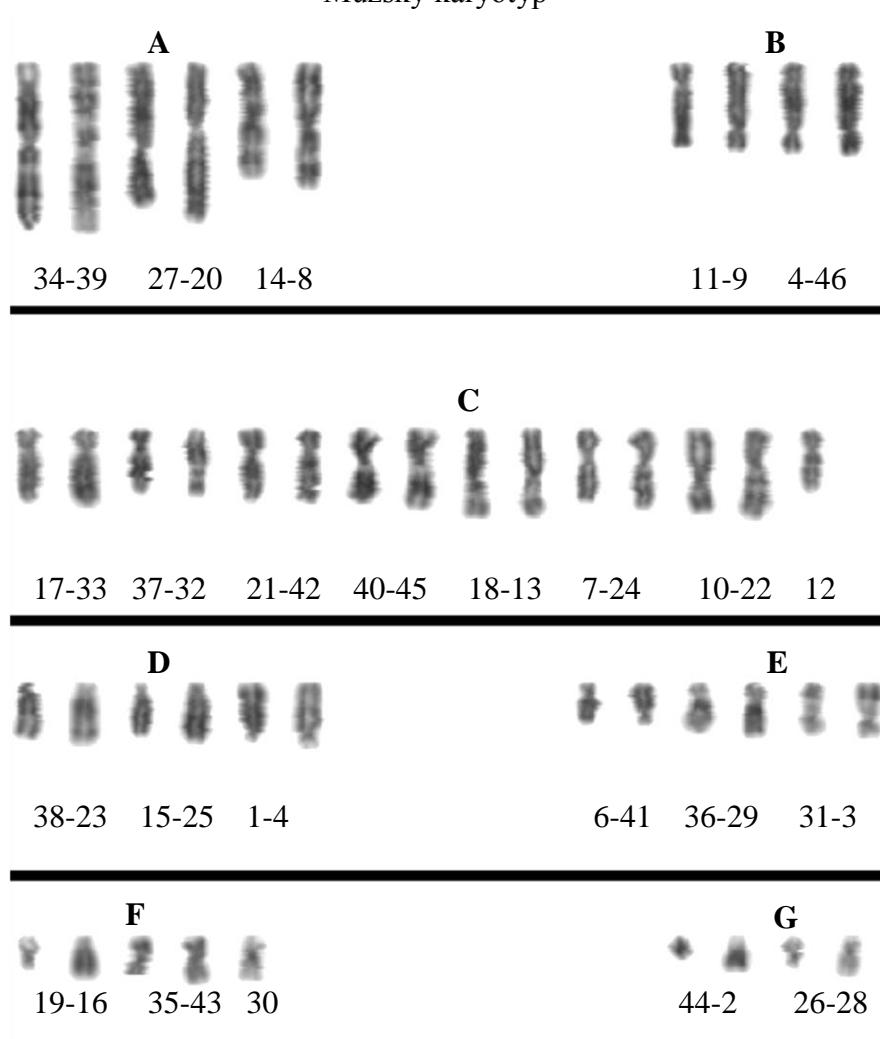
- Vyhodnocení mužského karyotypu

Algoritmus byl vyzkoušen i na snímek mužského pohlaví (Obr. 5.4), výsledné seřazení do párů chromosomů je znázorněné na Obr. 5.5. Ve skupině C a F je lichý počet chromosomu, způsobený tím, že mužské pohlavní chromosomy nejsou stejně dlouhé. Proto by se chromosom, který nemá druhého do páru, mohl považovat za pohlavní.



Obr. 5.4: Mikroskopický snímek, 46XY

Mužský karyotyp



Obr. 5.5: Výsledný mužský karyotyp - korelace

Tabulka 5: Výsledky párování chromosomů - Obr. 5.4 , 46XY

	Korelace	Kosinové kritérium	Euklidovská vzdálenost	Ručně
1.	34- 39	34-39	27-34	34-39
2.	27-20	11-27	11-39	27-20
3.	14-8	9-20	46-20	14-8
4.	11-9	14-8	5-14	11-9
5.	5-46	5-46	9-8	5-46
6.	17-33	17-33	37-40	18-13
7.	37-32	21-42	32-45	24-22
8.	21-42	7-24	33-18	17-33
9.	40-45	37-32	13-22	10-21
10.	18-13	13-22	21-10	12-42
11.	7-24	40-45	17-13	40-45
12.	10-22	12-18	42-24	37-32
13.	38 -23	38-23	15-25	25-15
14.	15-25	15-25	1-4	23-1
15.	1-4	1-4	38-23	4-38
16.	6 -41	6-41	41-3	29-36
17.	36 -29	31-3	6-29	31-3
18.	31 -3	36-29	36-31	6-41
19.	19 -16	19-30	19-16	19-30
20.	35-43	35-43	35-43	43-35
21.	44-2	44-2	26-2	44-2
22.	26-28	26-28	44-28	28-26
23. (X, Y)	12 ,30	10,16	7,30	7,16
Správných párů	16	15,5	3,5	23
Úspěšnost [%]	69,5	67,4	15,2	100

V tabulce 5 jsou uvedeny páry chromosomů z mikroskopického snímku (Obr. 5.4), kde kvalita napruhování chromosomů byla celkem nízká.

Při vyhodnocování párů chromosomu pomocí metody s využitím Euklidovské vzdálenosti byla úspěšnost přiřazení správného páru velmi nízká, kolem 15 %. Oproti tomu korelace a kosinové kritérium měli poměrně stejný počet správně přiřazených párů chromosomů, 69% úspěšnost. U korelace byly nesprávně přiřazeny páry chromosomů

ve skupině C a F, v těchto skupinách se vyskytují pohlavní chromosomy. Ani jeden pohlavní chromosom pomocí korelace nebyl správně určený. Kosinovo kritérium bylo nepřesné v určování párů opět ve skupině C a A. Na rozdíl od ostatních metod správně napároval chromosomy ve skupině F, tím pádem byl vyhodnocený i jeden pohlavní chromosom.

Závěr

Hlavním cílem této diplomové práce bylo navrhnout a zrealizovat software pro obrazovou analýzu mitotických chromosomů. V úvodních kapitolách bylo pojednáváno o základech cytogenetiky, popisu lidských chromosomů a jejich vlastnosti i možných aberací, kterou mohou nastat při nesprávném buněčném dělení. Dále byly v práci popsány základní cytogenetické metody, které se využívají v praxi pro vizualizaci chromosomů.

Mezi nejpoužívanější metody pro zobrazování chromosomů jsou barvicí metody G-pruhování nebo FISH. G-pruhování je základní metoda pro určení jak strukturálních, tak numerických aberací. Pokud je podezření na chromosomální aberaci, vyhodnocení udaného pacienta se provádí z několika mitóz (řádově desítky). Pro potvrzení strukturálních abnormalit se využívá metoda FISH. Zde se používají dané sondy, které jsou vymezeny přímo na určitá místa v chromosomech, a po vizualizaci se zjistí, zdali došlo např. k translokaci chromosomu nebo jiné strukturální přestavbě.

V praktické části se využívaly mikroskopické snímky, které byly barveny metodou

G-pruhování. Snímky byly získány z cytogenetických laboratoří. Hlavním cílem praktické části bylo navrhnout a zrealizovat algoritmus pro vyhodnocování mitotických chromosomů z mikroskopických snímků.

Celkové vyhodnocování karyotypu jak z mikroskopu, tak z mikroskopického snímku je náročné. Mikroskopické snímky byly pořízené z mikroskopu v jasovém poli a nabývaly šedotónové hodnoty jasu.

Navrhnutý algoritmus je složený z několika hlavních oddílů. První část je načtení mikroskopického snímku, na kterém jsou provedeny prvotní úpravy. Dochází k transformaci jasu a následnému prahování, kdy získáme z šedotónového binární obraz. Druhou částí v předzpracování je využití morfologických operací na binárním obraze. Mezi dvě základní a nejpoužívanější operace patřila skeletonizace a konturace, které vymezovaly jednotlivé oblasti chromosomů. Zde se narazilo na problém, který byl z jisté míry vyřešený automaticky a do jisté míry byl nutný zásah uživatele. Jedná se o oblasti chromosomu, které se překrývají nebo jsou v těsné blízkost. Z dané části algoritmu byl získán jeden z hlavních parametrů a to délka.

Další parametry, které bylo nutné získat pro klasifikaci - obsahy a jasové profily chromosomů. Z daných parametrů ve vzájemné kombinaci byl navržený algoritmus pro vyhodnocování karyotypů. Pro konečné spojení chromosomů do párů byly

vyzkoušeny tři vyhodnocovací kritéria- korelace, kosinové kritérium a Euklidovská vzdálenost. Vyhodnocení pomocí korelace nebo kosinového kritéria bylo úspěšnější než pomocí Euklidovské vzdálenosti. Při klasifikaci chromosomů do skupin, byla problematická skupina C, která obsahuje nejvíce párů chromosomů a též pohlavní chromosomy. U ženského pohlaví jsou oba pohlavní chromosomy ve skupině C oproti mužskému, kdy jeden chromosom má v C skupině a druhý ve skupině F.

Jeden z hlavních problémů byly málo kvalitní mikroskopické snímky, to už bylo jedním z důvodů nepřesného následujícího vyhodnocení.

V praxi se provádí vyhodnocování pomocí speciálního softwaru, který roztrídí chromosomy do jednotlivých tříd, i na dané pozice v porovnání s ideogramem v karyotypu. Jelikož jsem měla možnost si vyzkoušet práci s daným softwarem, bylo to velkým přínosem pro tvorbu algoritmu. Velmi záleželo na nasnímání mikroskopického snímku a to jak v nastavení osvětlení, tak v zaostření snímajících mitóz. Při předzpracování obrazu bylo nutné, aby uživatel předzpracovaný obraz zkontroloval, jestli jsou všechny chromosomy rozshlukovány a jestli nejsou detekovány nečistoty, před samotným spuštěním karyotypizace. Uživatel následně výsledný karyotyp zkontroloval a určil, zda jsou všechny chromosomy správně roztríděné a spárované. Je nutno zmínit, že i zde se vyskytovaly chybně zařazené páry chromosomů a to převážně ve skupině C, kdy docházelo i k přiřazení více chromosomů k jednomu chromosomu.

Přestože se v práci nepodařilo dosáhnout zcela optimálních algoritmů, pro ideální klasifikaci chromosomových párů byly však výsledky dostatečné.

Seznam zkratek

XX, XY	pohlavní chromosomy
G pruhy	metod G- pruhování
p	krátké raménko
q	dlouhé raménko
NOR oblast	oblasti satelitu v akrocentrických chromosomech
T	označení trisomie (T21 – trisomie na 21 chromosomu)
FISH	Fluorescenční In Situ hybridizace
px	pixel

Literatura

- [1] KEAGLE, Martha B. *The principles of clinical cytogenetics*. 2nd ed. Totowa, N.J.: Humana Press, 2005, xiii, 596 p. ISBN 15-925-9833-1.
- [2] NUSSBAUM, Robert L., Huntington F. WILLARD a Roderick R. MCINNES. *Klinická genetika Thompson & Thompson*. Vyd. 1. Praha: Triton, 2004. ISBN 80-725-4475-6.
- [3] KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahúše NOVOTNÁ. *Klinická cytogenetika I.: Úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 2., upr. vyd. Praha: Karolinum, 2010, 134 s. ISBN 978-802-4618-807.
- [4] ŠÍPEK, Antonín. Genetika- Biologie. *Chromozomy* [online]. 2010 [cit. 2013-11-09]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/chromozomy>
- [5] ŠÍPEK, Antonín. <http://www.gate2biotech.cz/nove-objevy-ve-vyzkumu-telomer-telomery-jsou-koncove-useky-eukaryotnich/>. *Nové objevy ve výzkumu telomer* [online]. 23.5.2011, [cit. 2013-11-03]. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/nove-objevy-ve-vyzkumu-telomer-telomery-jsou-koncove-useky-eukaryotnich/>
- [6] SHAFFER, Lisa G, Jean MCGOWAN-JORDAN a M SCHMID. *ISCN 2013: an international system for human cytogenetic nomenclature (2013)*. Basel: Karger, c2013, p. ISBN 978-331-8022-537
- [7] Chromosomální abnormality. *Wikiskripta.eu* [online]. [cit. 2014-05-02]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Chromozom%C3%A1ln%C3%AD_abnormality
- [8] Strukturní chromozomové aberace. *Wikiskripta.eu* [online]. [cit. 2014-05-02]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Strukturn%C3%AD_chromozomov%C3%A9_a_berace

- [9] *Cytogenetika* [online]. 2007 [cit. 2014-05-03]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/kot/resources/studijni-materialy/bc-skripta/kapitola05.pdf>
- [10] BICKMORE, Wendy A. Karyotype Analysis and Chromosome Banding. Encyclopedia of Life Sciences. London: Nature Publishing Group, 2001, April 2001. Dostupné z: <http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0001160.html>
- [11] COMINGS, David E. Chromosome banding. The Journal of Hostom Chemistry and Cytochemistry. 1975, č. 23. Dostupné z: <http://jhc.sagepub.com/content/23/7/461.full.pdf+html>
- [12] Chromosomy, Chromatidy a Chromatin [online]. 2014 [cit. 2014-05-04]. Dostupné z: <https://khanovaskola.cz/bunky-a-bunecne-deleni/chromosomy-chromatidy-a-chromatin/lekce>
- [13] O'CONNOR, Clare. Karyotyping for Chromosomal Abnormalities. Nature Education. 2008, č. 1. Dostupné z: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/karyotyping-for-chromosomal-abnormalities-298>
- [14] O'CONNOR, Clare. Chromosome Mapping: Idiograms. Nature Education. 2008, č. 1. Dostupné z: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/chromosome-mapping-idiograms-302>
- [15] O'CONNOR, Clare. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). Nature Education. 2008, č. 1. Dostupné z: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/fluorescence-in-situ-hybridization-fish-327>
- [16] ZEMANOVÁ, Zuzana a Kyra MICHALOVÁ. Návrh laboratorní směrnice pro molekulárněcytogenetickou analýzu chromosomových odchylek v

nádorových buňkách metodou fluorescenční insitu hybridizace (FISH). 2003. Společnost lékařské genetiky. Dostupné z: www.slg.cz/system/files/blr-fish.pdf

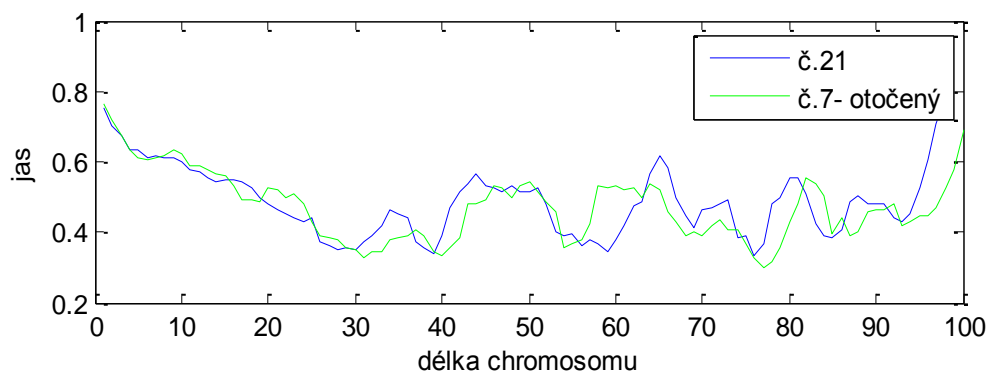
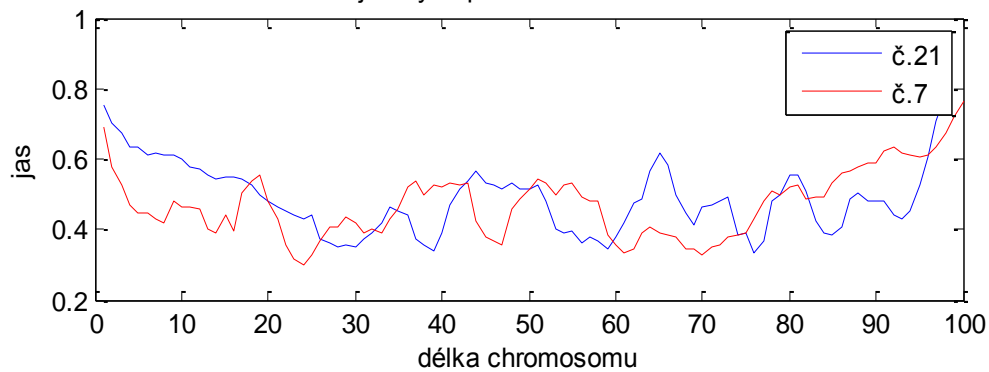
- [17] OTSU, Nobuyuki. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Transactions*. 1979, č. 01.
- [18] PIPER, Jim a Erik GRANUM. On fully automatic feature measurement for banded chromosome classification. *Cytometry*. 1989, vol. 10, issue 3, s. 242-255.
- [19] DOBEŠ, Michal. *Zpracování obrazu a algoritmy v C#*. 1. vyd. Praha: BEN - technická literatura, 2008, 143 s. ISBN 978-80-7300-233-6.
- [20] Segmentace a detekce geometrických primitiv. *Počítačové vidění* [online]. 2012 [cit. 2014-01-05]. Dostupné z: <http://www.uamt.feec.vutbr.cz/vision/TEACHING/MPOV/05%20-%20Segmentace%20a%20detekce%20geometrickych%20primitiv.pdf>
- [21] Edwardsův a Patauův syndrom. Vitalion [online]. 2014 [cit. 2014-05-12]. Dostupné z: <http://nemoci.vitalion.cz/edwardsuv-a-patauuv-syndrom/>
- [22] Chromosomové aberace. Genetika Biologie [online]. 2014 [cit. 2014-05-12]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/chromozomove-aberace>
- [23] Gennet, centrum lékařské genetiky a reprodukční genetiky [online]. 2010 [cit. 2014-05-12]. Dostupné z: <http://www.gennet.cz/cytogeneticka-laborator-karyotyp.html>
- [24] Vrozené vady - Downův syndrom. Vrozené vady [online]. 2013 [cit. 2014-05-12]. Dostupné z: http://www.vrozene-vady.cz/vrozene-vady/index.php?co=downuv_syndrom
- [25] WALEK, Petr, Martin LAMOŠ a Jiří JAN. Analýza biomedicínských obrazů [online]. 2013 [cit. 2014-05-12]. ISBN 978-80-214-4792-9.

- [26] GAJENDRAN, V., RODRI, X aj.J. GUEZ. Chromosome counting via digital image analysis. In Image Processing, 2004. ICIP 04. 2004 International Conference on 2004, vol. 5, p. 2929-2932 Vol. 2925
- [27] GRISAN, Enrico, Enea POLETTI, Christopher TOMELLERI a Alfredo RUGGERI. Automatic segmentation of chromosomes in Q-band images. *IEEE*. 2007, č. 7.
- [28] MORSE, Brayan. Thresholding. *Brigham Young University*. 2000, č. 1.
- [29] ZPRACOVÁNÍ DIGITALIZOVANÉHO OBRAZU [online]. 2013 [cit. 2014-01-05]. Dostupné z: <http://www.kky.zcu.cz/cs/courses/zdo>
- [30] GRISAN, Enrico. Automatic Segmentation and Disentangling of Chromosomes in Q-Band Prometaphase Images. *IEEE TRANSACTIONS ON INFORMATION TECHNOLOGY IN BIOMEDICINE*. 2009, č. 4. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/stamp/stamp.jsp?tp=&arnumber=4773198&tag=1>
- [31] MatlabWorks [online]. 2014 [cit. 2014-05-21]. Dostupné z: http://www.mathworks.com/index.html?s_tid=gn_logo

Přílohy

A. Správná klasifikace chromosomových párů

Porovnání jasových profilů chromosomu č.21 a č.7



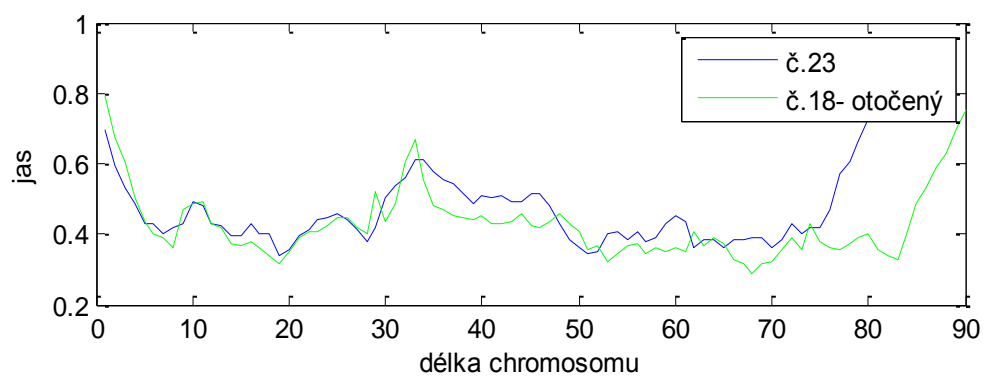
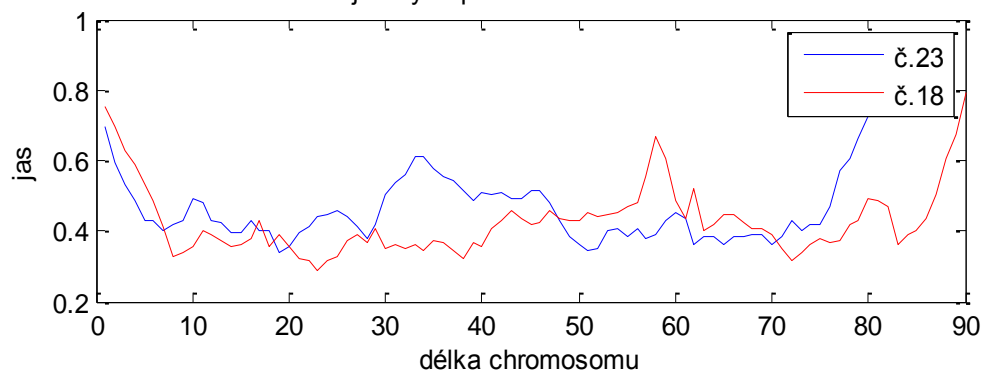
Jasový profil chromosomu č. 21



Jasový profil chromosomu č. 7



Porovnání jasových profilů chromosomu č.23 a č.18



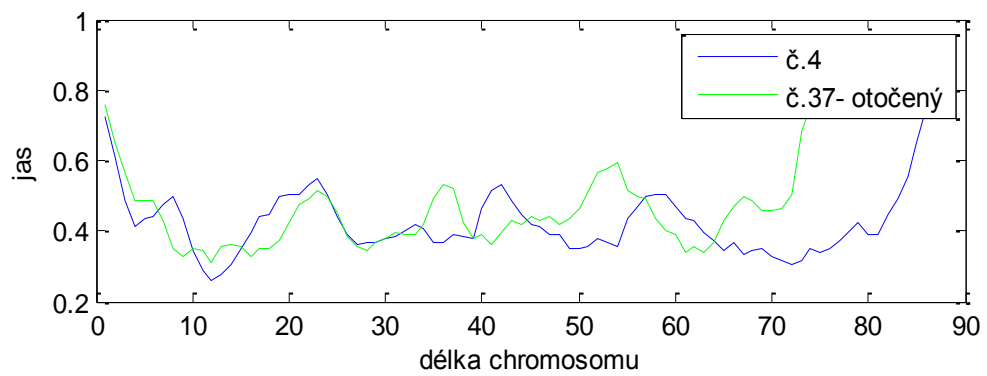
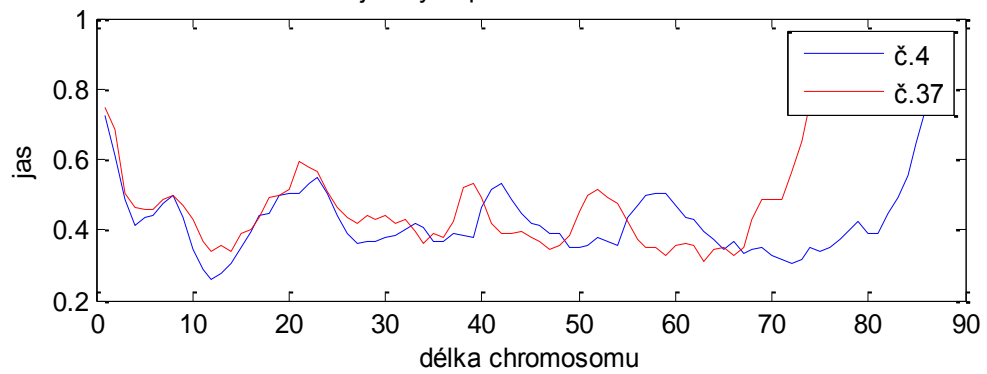
Jasový profil chromosomu č. 23



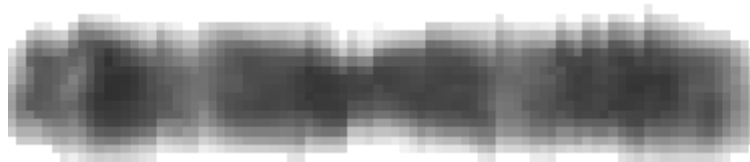
Jasový profil chromosomu č. 18



Porovnání jasových profilů chromosomu č.4 a č.37



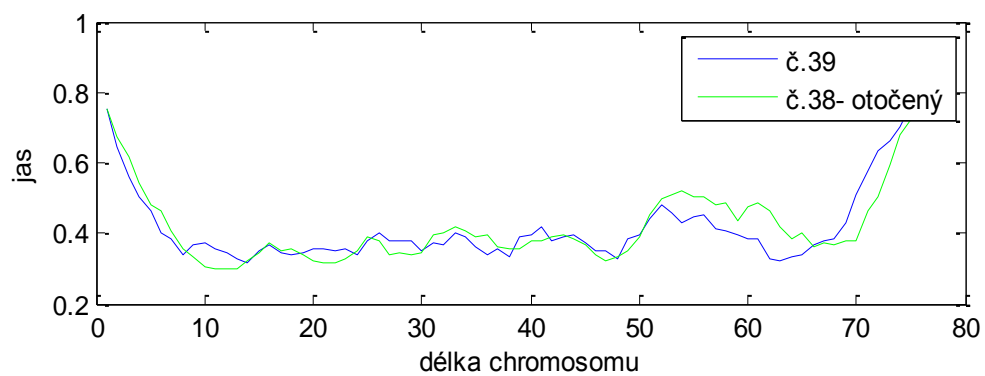
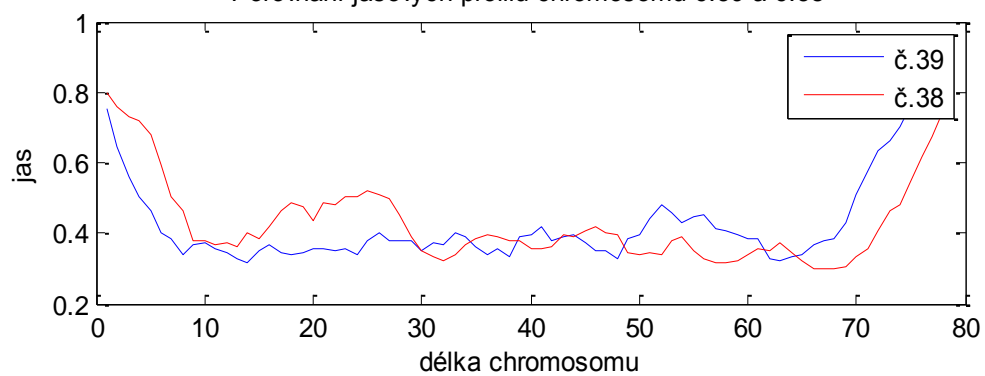
Jasový profil chromosomu č. 4



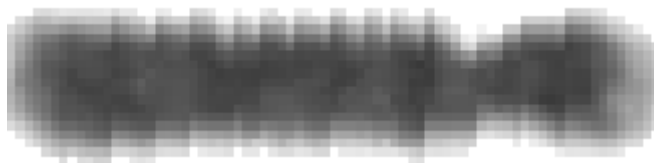
Jasový profil chromosomu č. 37



Porovnání jasových profilů chromosomu č.39 a č.38



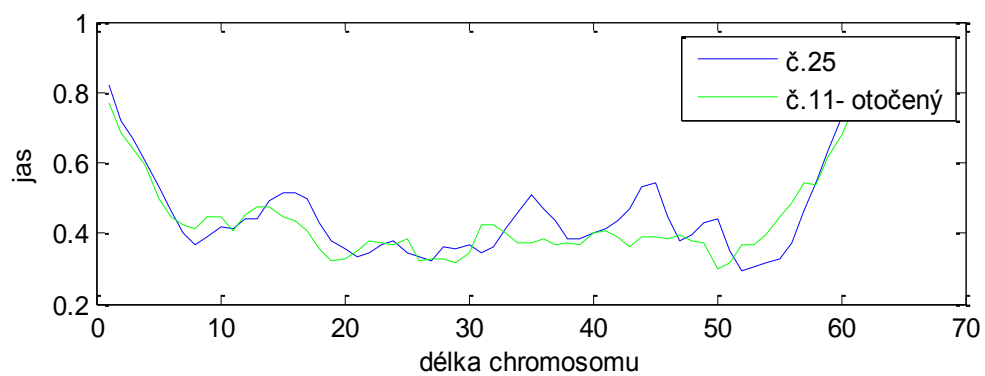
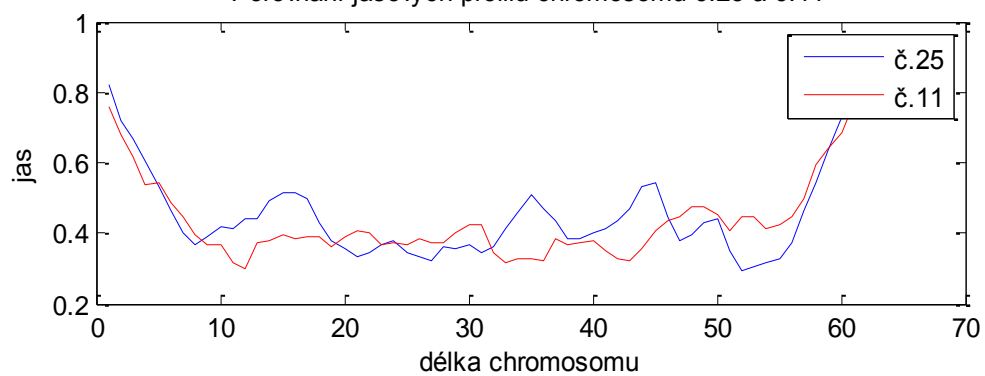
Jasový profil chromosomu č. 39



Jasový profil chromosomu č. 38



Porovnání jasových profilů chromosomu č.25 a č.11



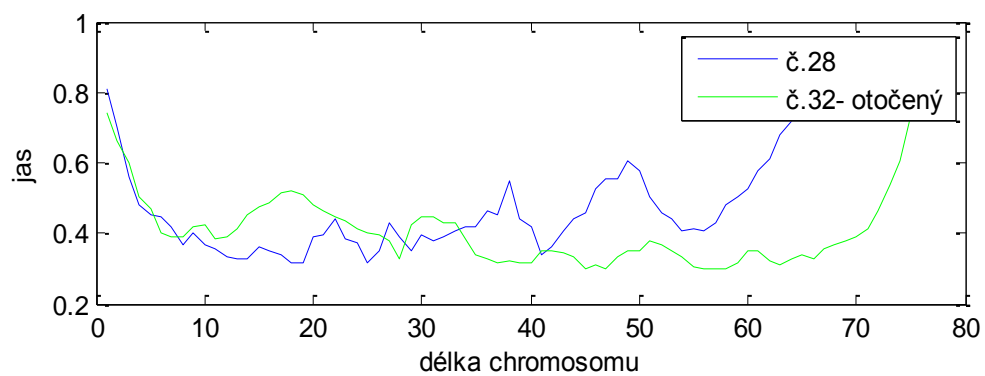
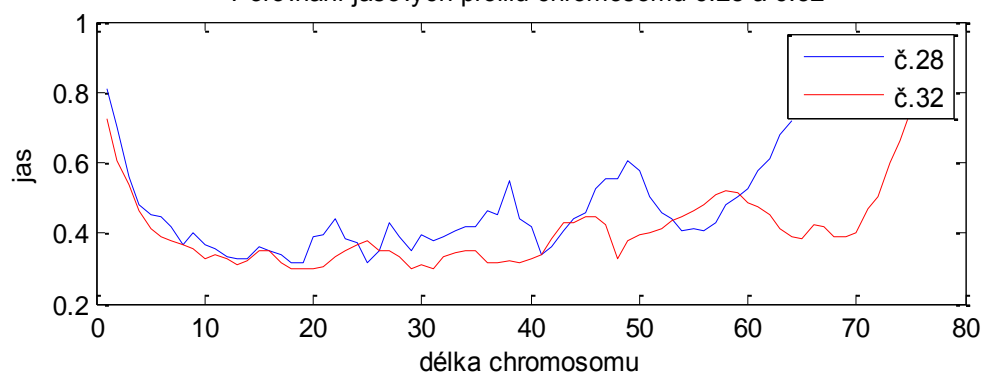
Jasový profil chromosomu č. 25



Jasový profil chromosomu č. 11



Porovnání jasových profilů chromosomu č.28 a č.32



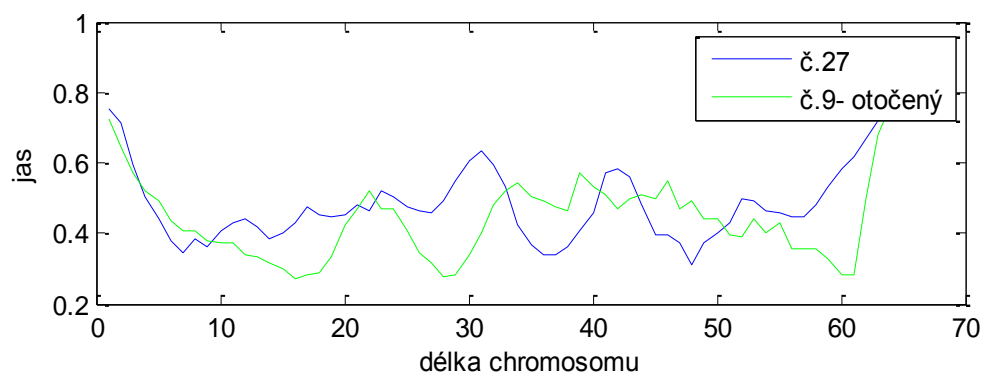
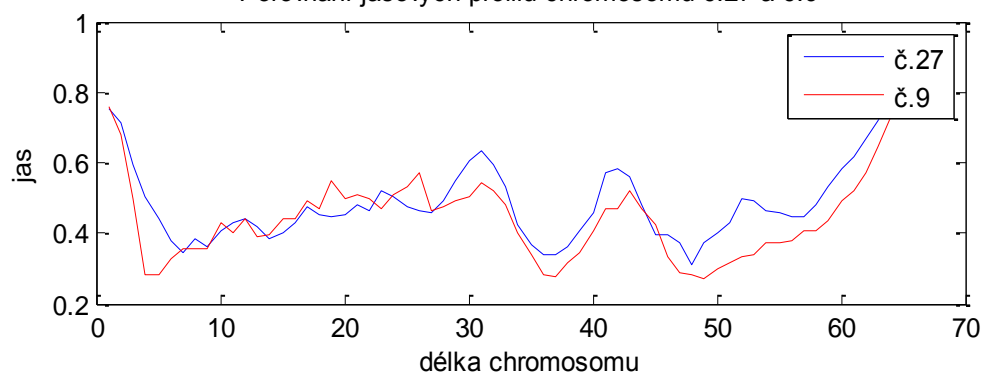
Jasový profil chromosomu č. 28



Jasový profil chromosomu č. 32



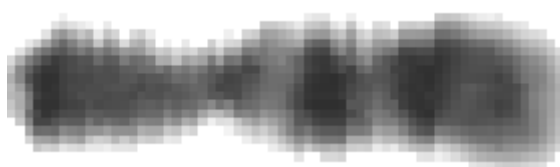
Porovnání jasových profilů chromosomu č.27 a č.9

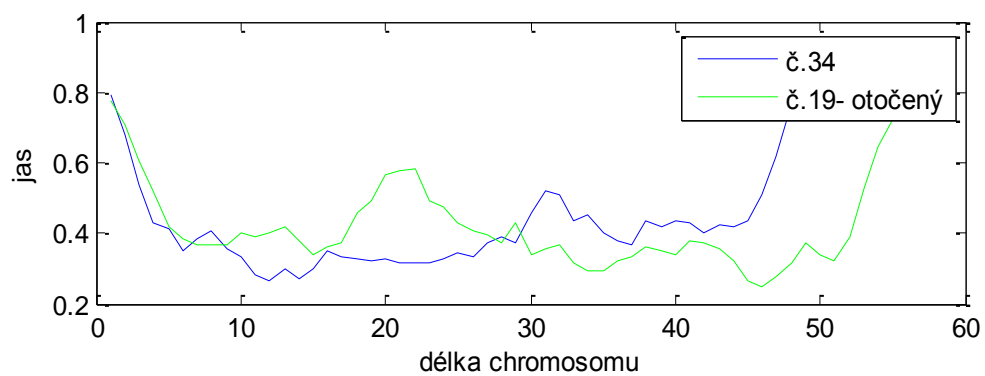
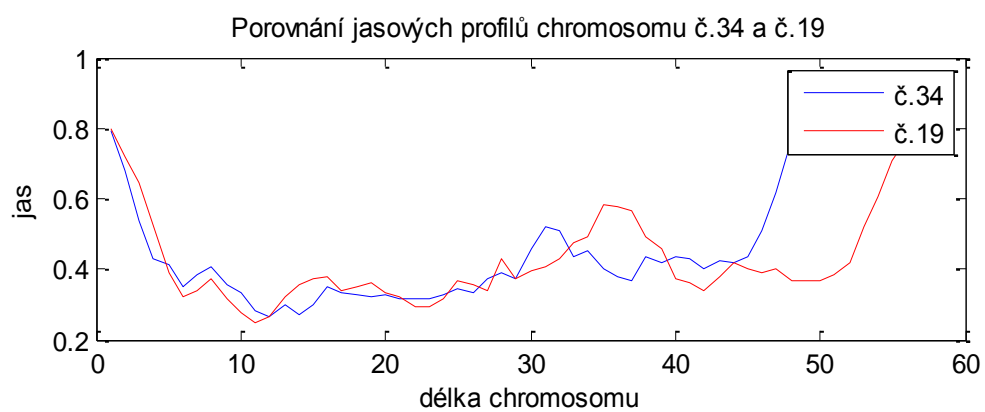


Jasový profil chromosomu č. 27



Jasový profil chromosomu č. 9



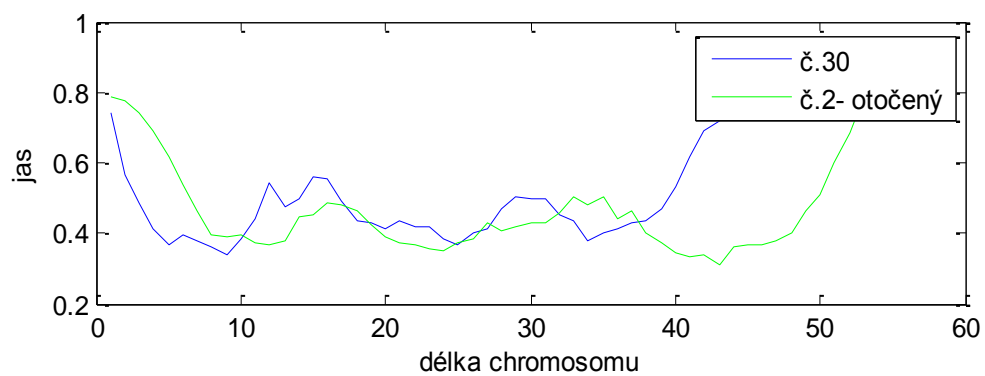
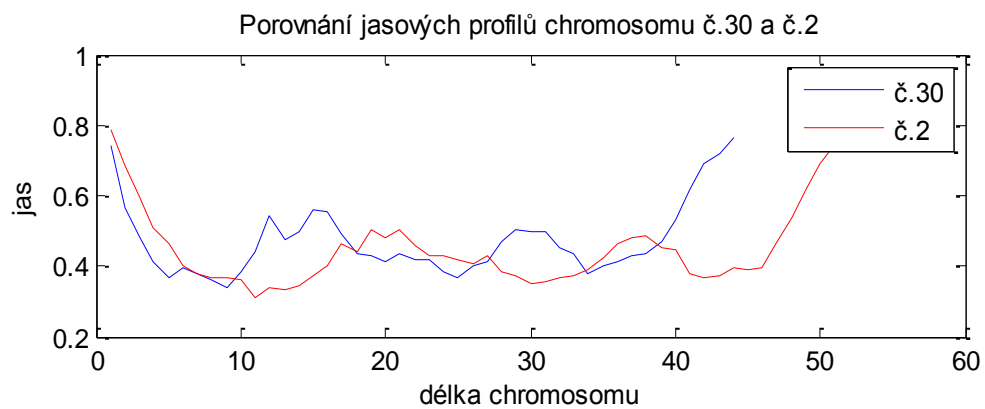


Jasový profil chromosomu č. 34



Jasový profil chromosomu č. 19

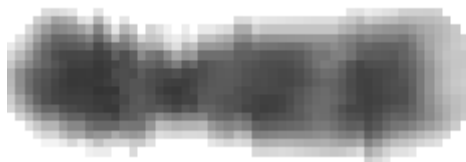


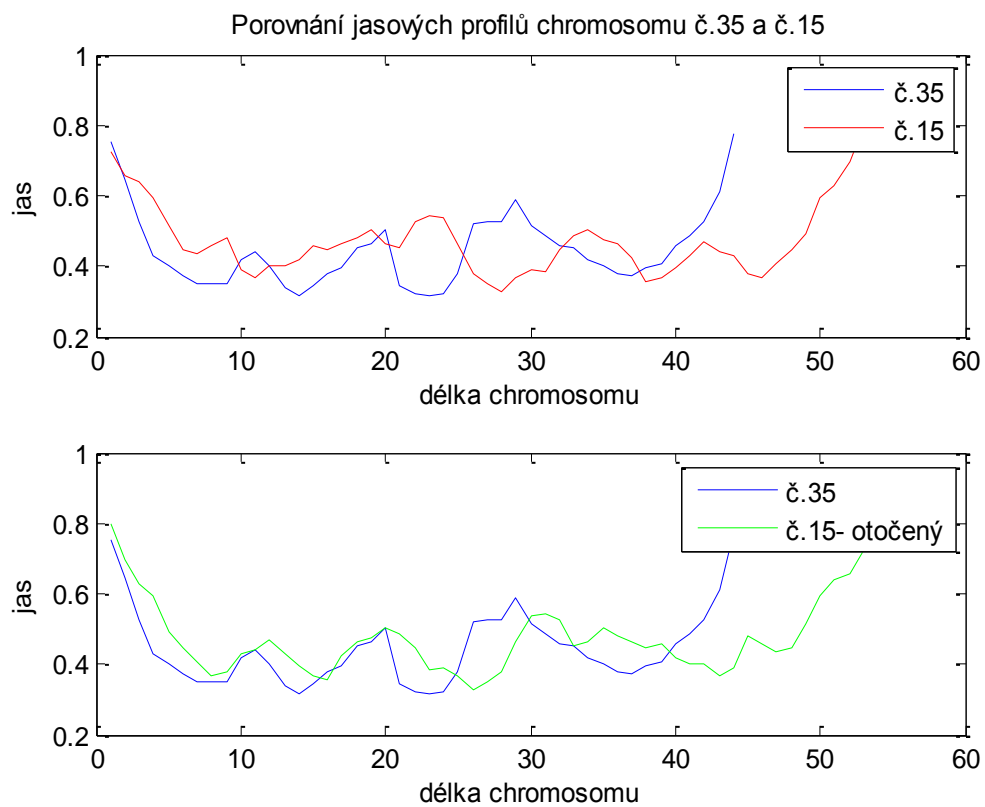


Jasový profil chromosomu č. 30



Jasový profil chromosomu č. 2





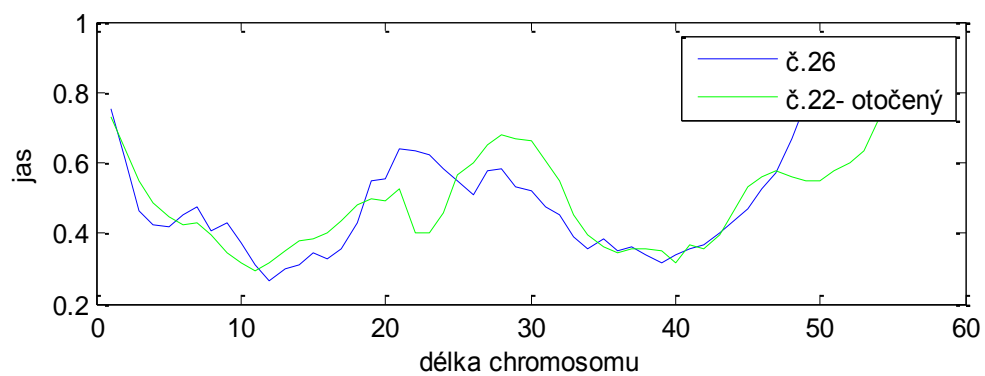
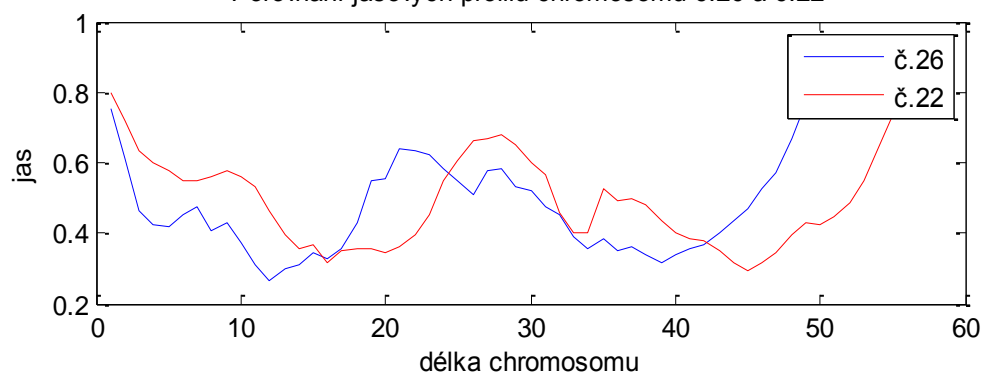
Jasový profil chromosomu č. 35



Jasový profil chromosomu č. 15



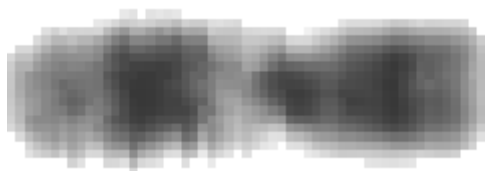
Porovnání jasových profilů chromosomu č.26 a č.22



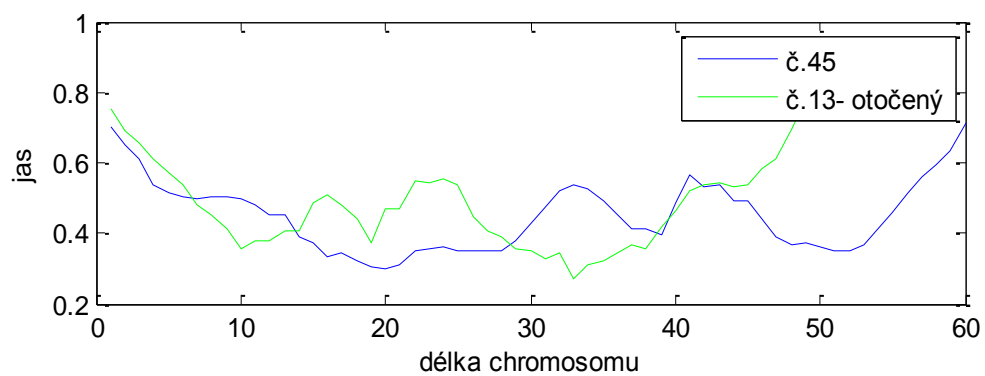
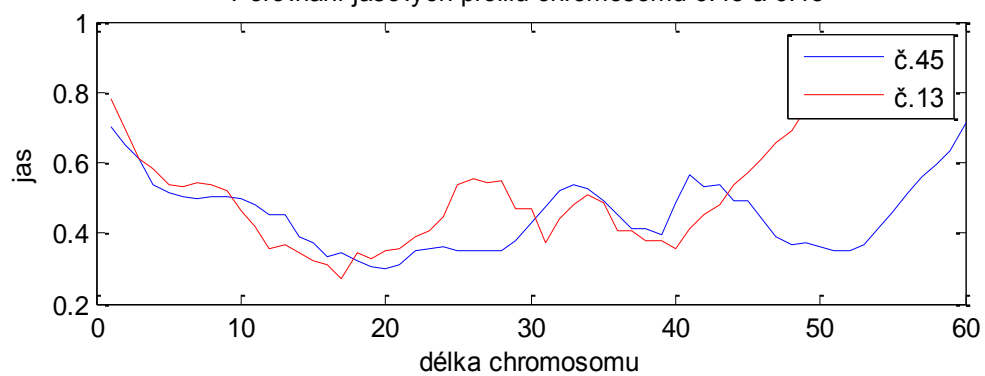
Jasový profil chromosomu č. 26



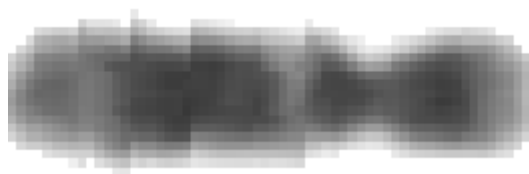
Jasový profil chromosomu č. 22



Porovnání jasových profilů chromosomu č.45 a č.13



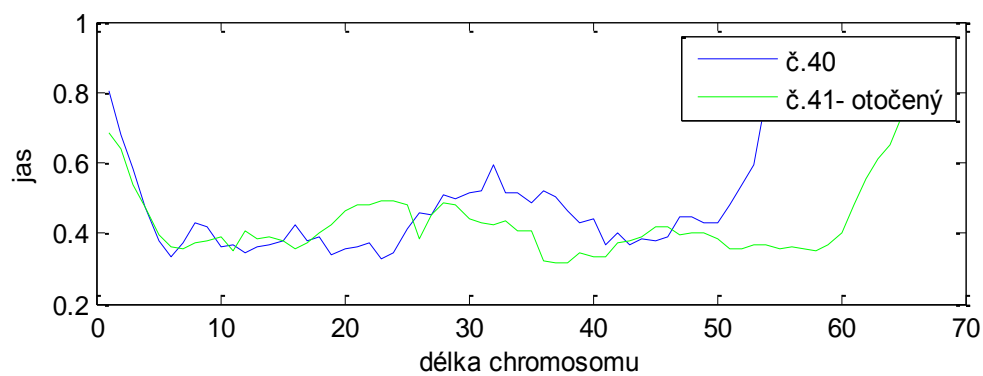
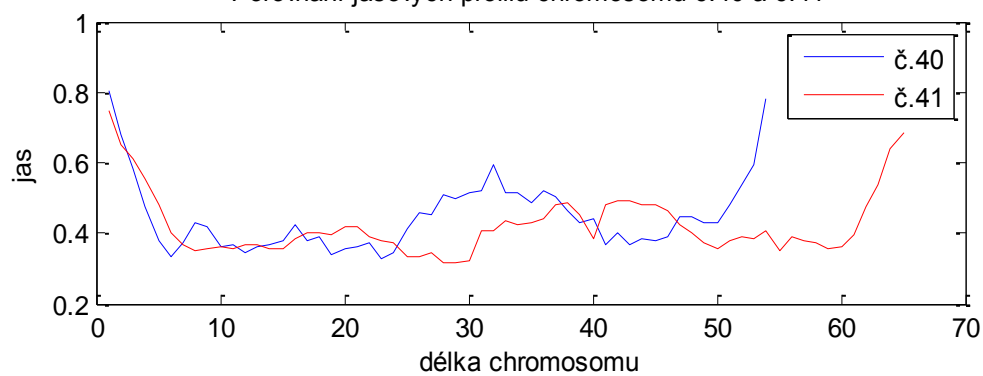
Jasový profil chromosomu č. 45



Jasový profil chromosomu č. 13



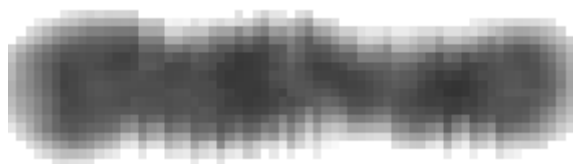
Porovnání jasových profilů chromosomu č.40 a č.41



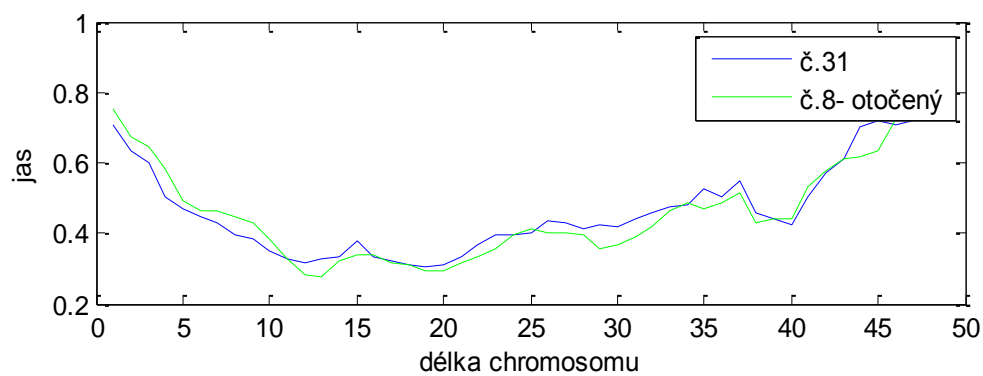
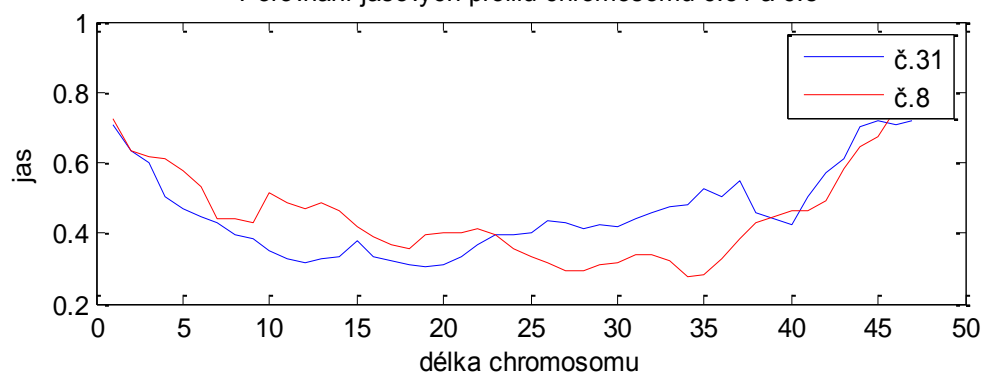
Jasový profil chromosomu č. 40



Jasový profil chromosomu č. 41



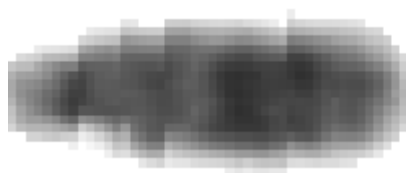
Porovnání jasových profilů chromosomu č.31 a č.8



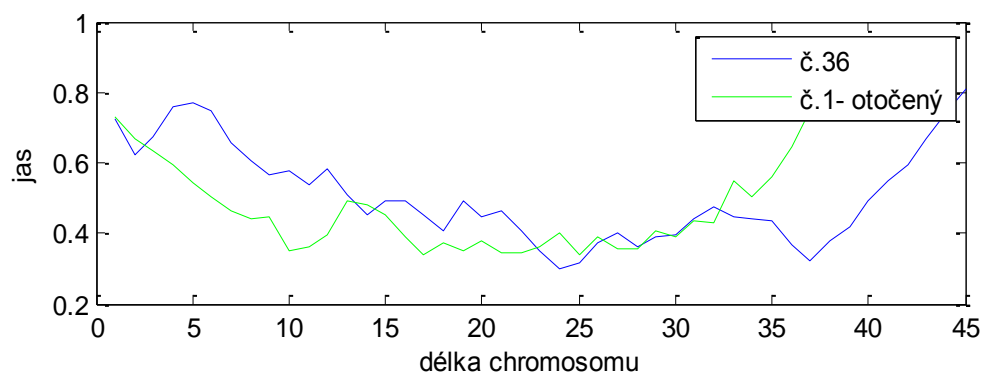
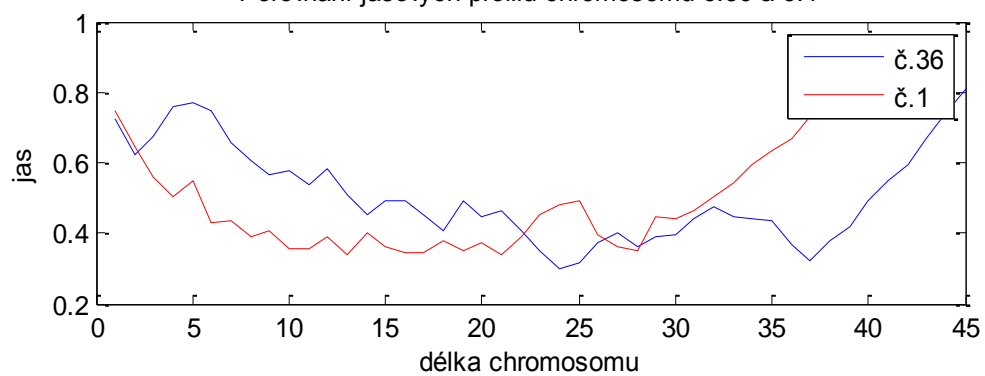
Jasový profil chromosomu č. 31



Jasový profil chromosomu č. 8



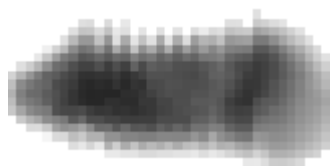
Porovnání jasových profilů chromosomu č.36 a č.1

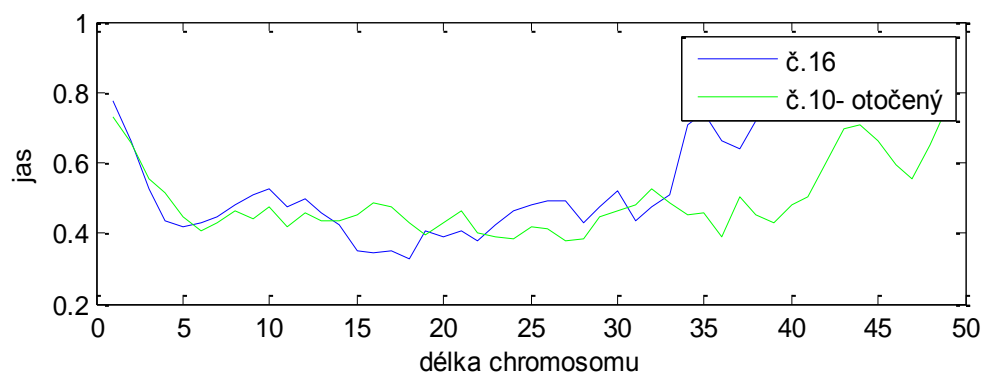
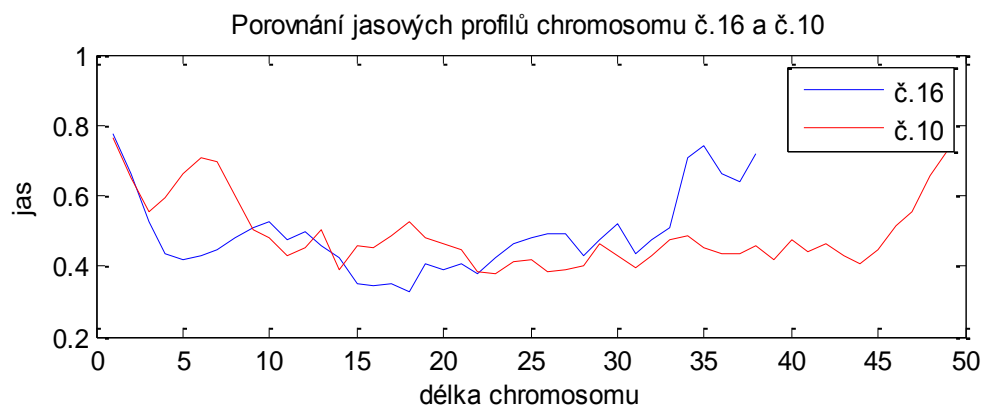


Jasový profil chromosomu č. 36

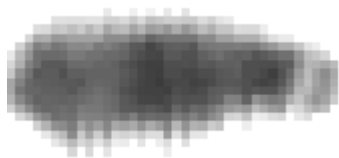


Jasový profil chromosomu č. 1

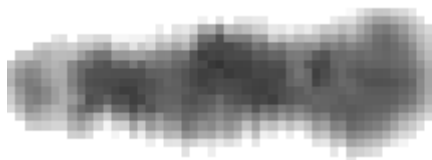


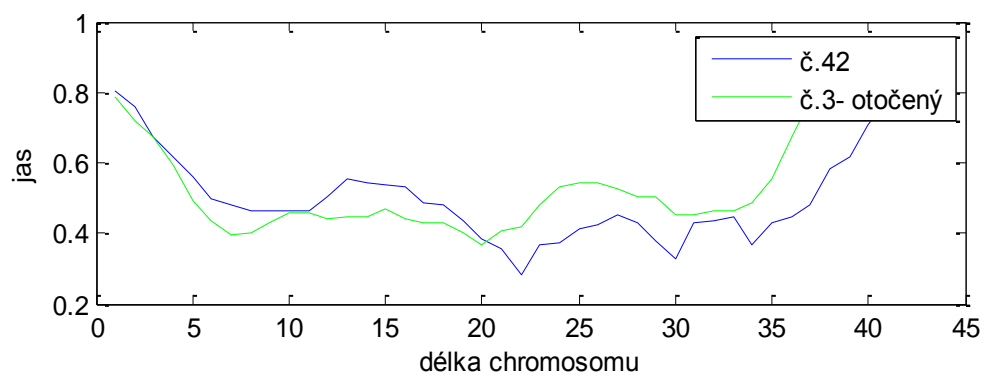
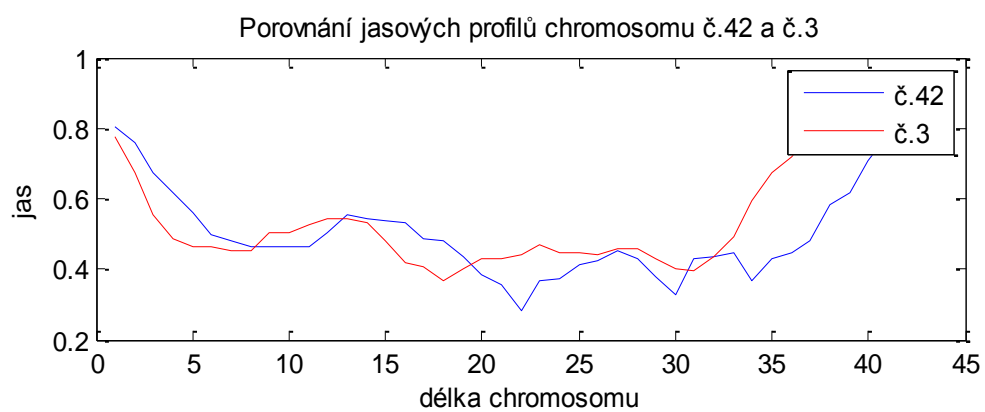


Jasový profil chromosomu č. 16



Jasový profil chromosomu č. 10

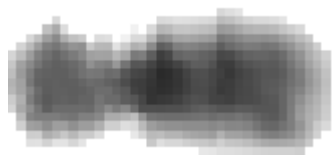


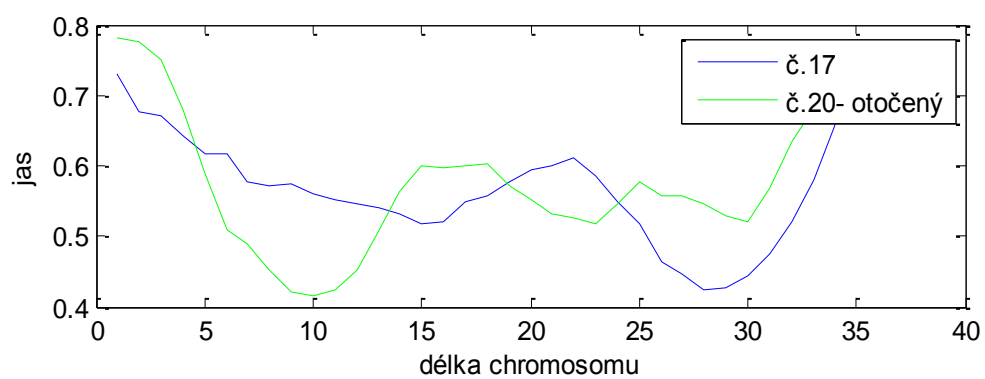
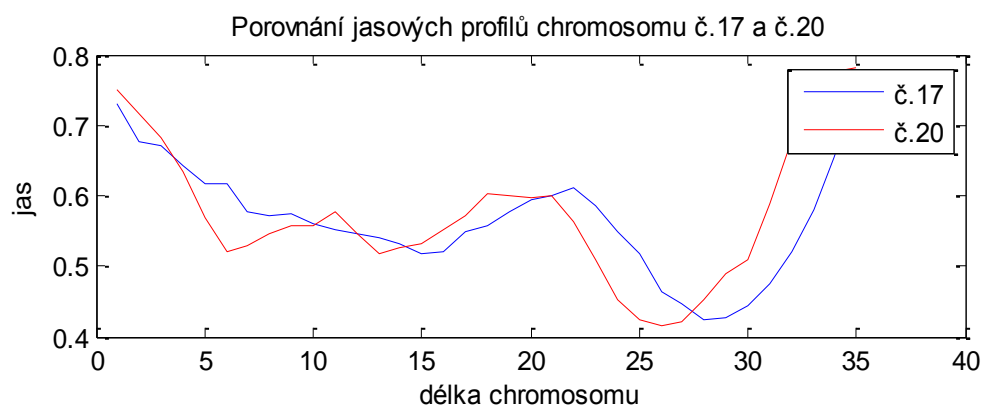


Jasový profil chromosomu č. 42



Jasový profil chromosomu č. 3



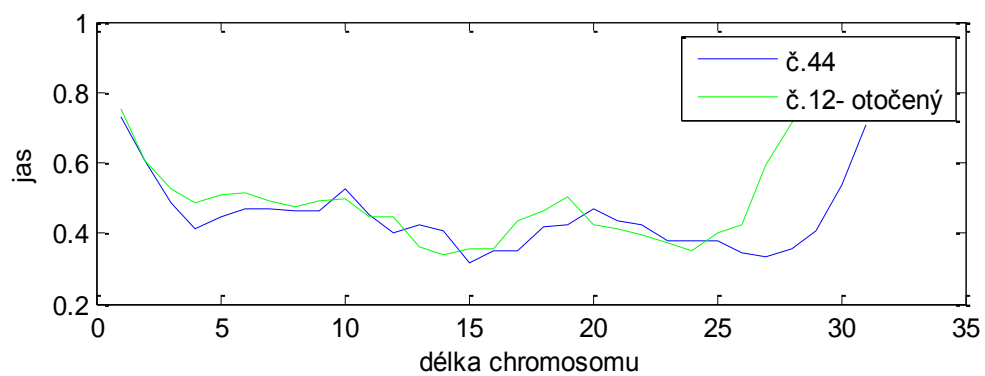
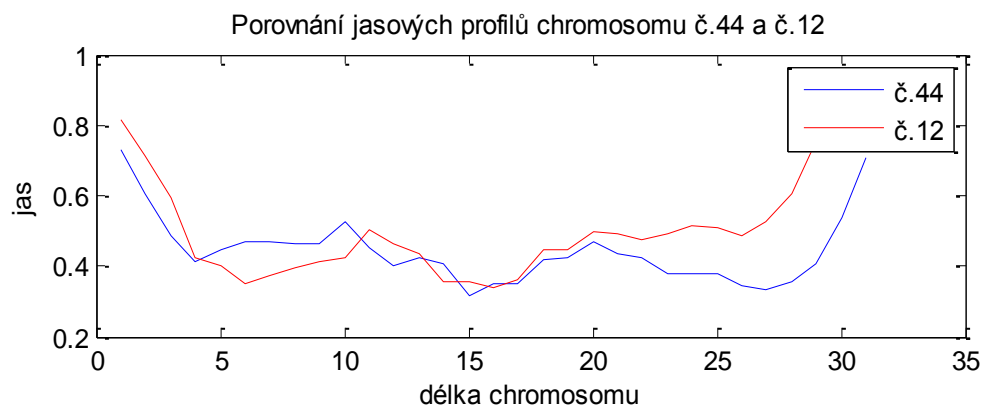


Jasový profil chromosomu č. 17



Jasový profil chromosomu č. 20



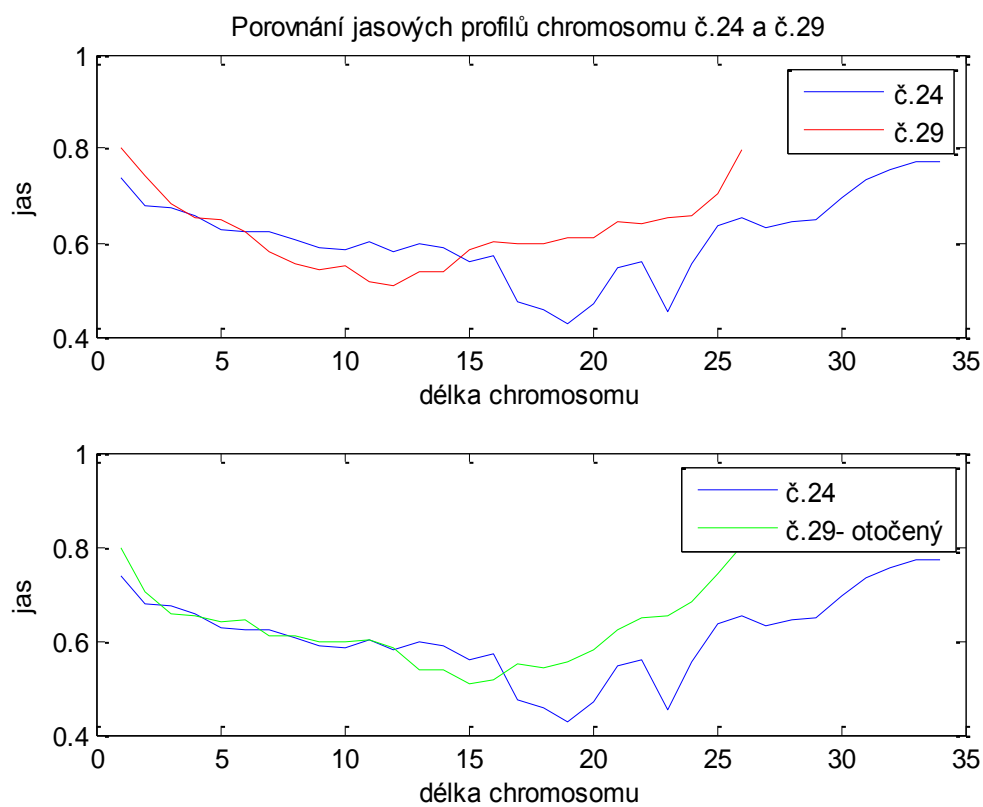


Jasový profil chromosomu č. 44



Jasový profil chromosomu č. 12



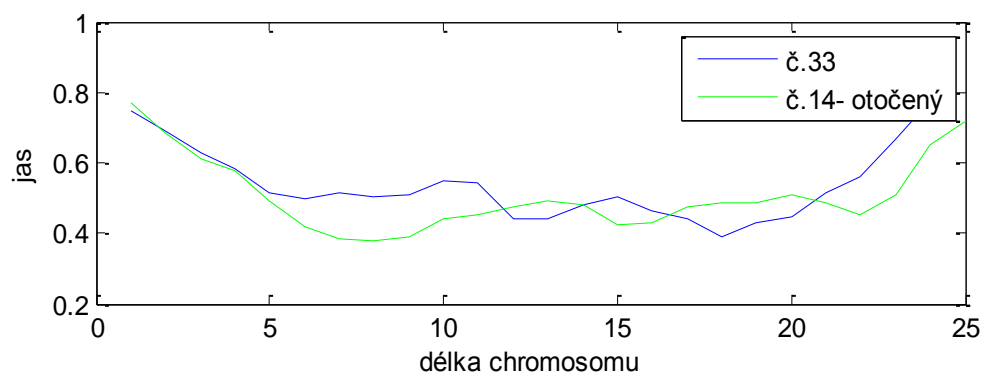
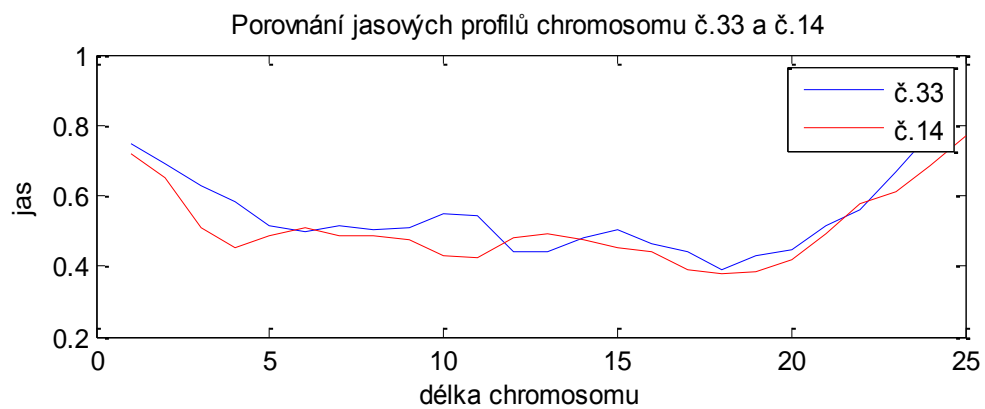


Jasový profil chromosomu č. 24



Jasový profil chromosomu č. 29

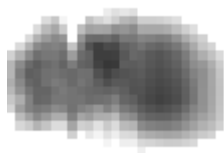


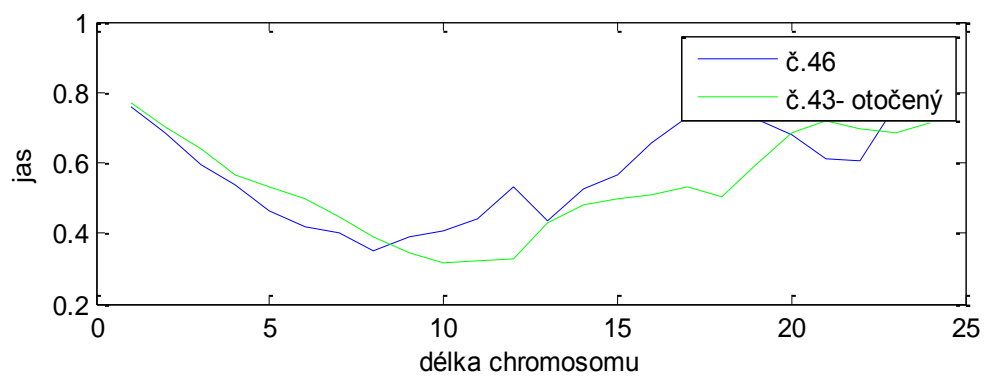
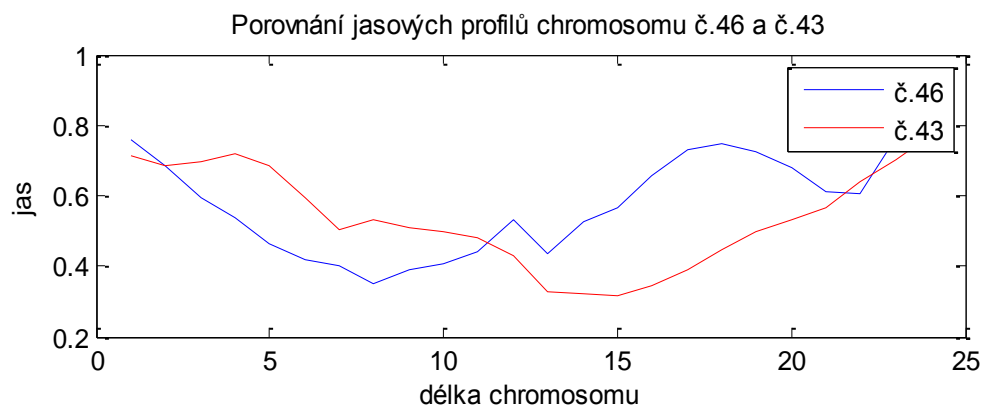


Jasový profil chromosomu č. 33

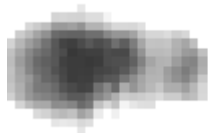


Jasový profil chromosomu č. 14

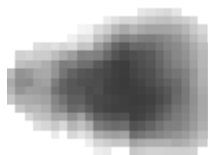


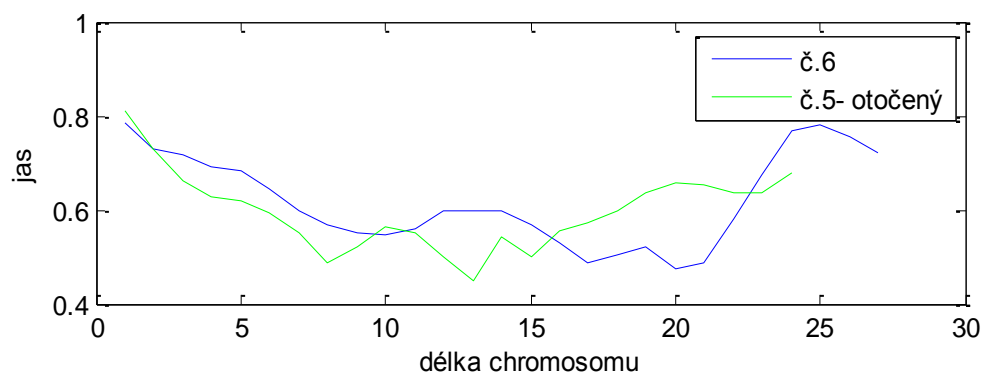
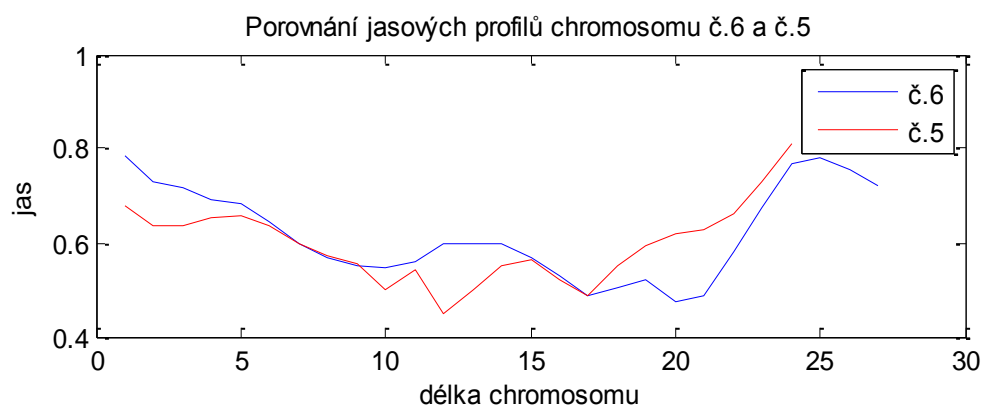


Jasový profil chromosomu č. 46

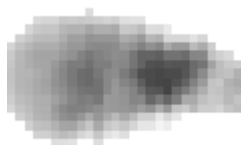


Jasový profil chromosomu č. 43





Jasový profil chromosomu č. 6

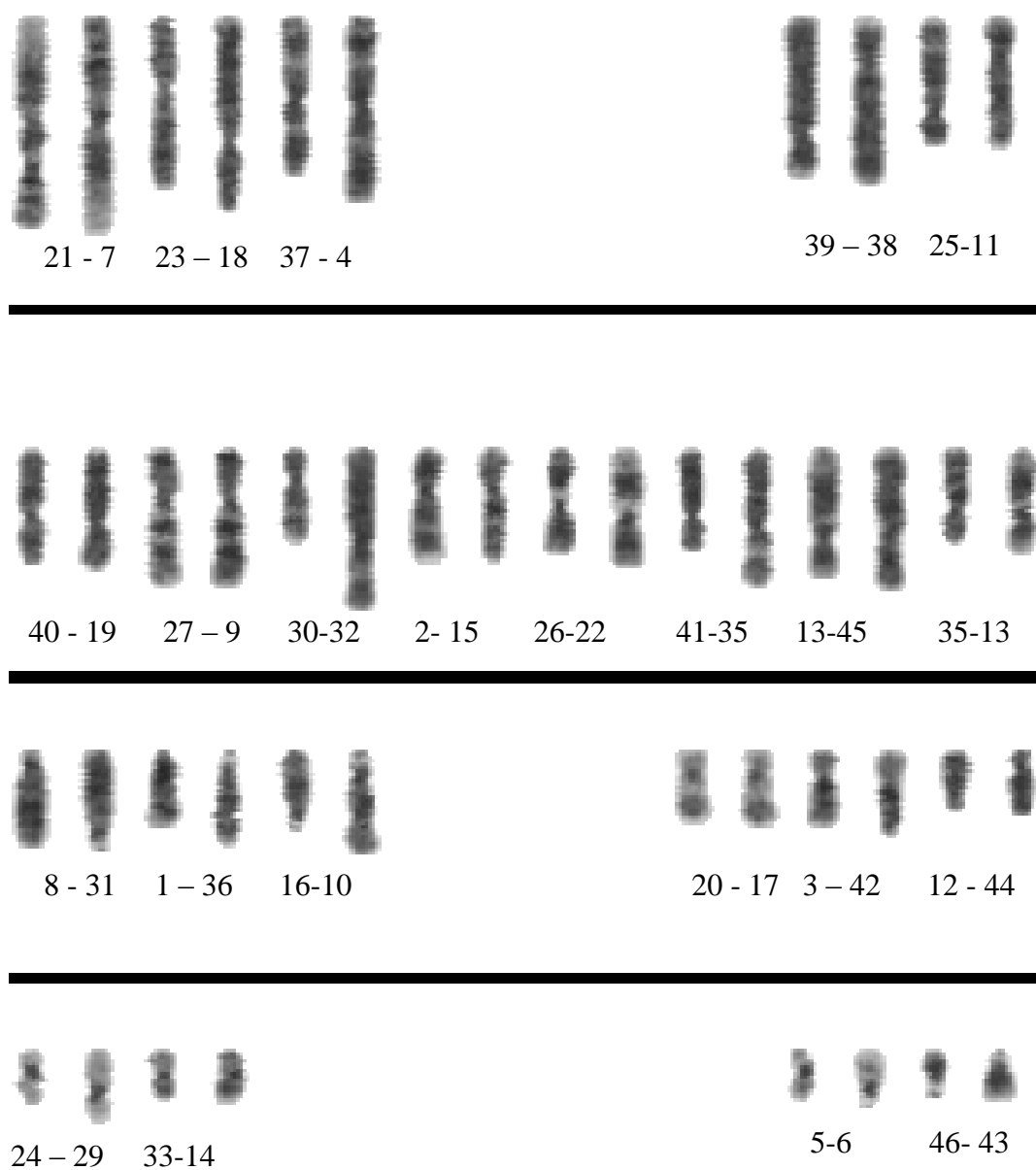


Jasový profil chromosomu č. 5



B. Ženský karyotyp – vyhodnocení pomocí kosinového kritéria

Ženský karyotyp



C. Ženský karyotyp – vyhodnocení pomocí Euklidovské vzdálenosti

Ženský karyotyp

